



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA CHEMICKÁ**  
**CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU**

FACULTY OF CHEMISTRY  
MATERIALS RESEARCH CENTRE

# **HYALURONANOVÉ HYDROGELY PRO MEDICÍNSKÉ APLIKACE**

HYALURONAN HYDROGELS FOR MEDICAL APPLICATIONS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**  
BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**  
AUTHOR

David Janča

**VEDOUCÍ PRÁCE**  
SUPERVISOR

Ing. TEREZA HALASOVÁ, Ph.D.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	<b>FCH-BAK0791/2013</b>	Akademický rok: <b>2013/2014</b>
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	<b>David Janča</b>	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	<b>Ing. Tereza Halasová, Ph.D.</b>	
Konzultanti:	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	

### Název bakalářské práce:

Hyaluronanové hydrogely pro medicínské aplikace

### Zadání bakalářské práce:

1. Zpracovat literární rešerši na téma hyaluronové hydrogely a jejich použitelnost pro medicínské aplikace
2. Provést experimenty na modelových systémech mapující vlastnosti hydrogelových matic na bázi hyaluronanu
3. Zhodnotit výsledky a použitelnost daných systémů pro medicínské aplikace z hlediska zkoumaných vlastností

### Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
David Janča  
Student(ka)

-----  
Ing. Tereza Halasová, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Tato práce se zabývá studiem vlastností hydrogelů připravených pomocí interakce polyelektrolytu hyaluronanu s kationaktivním tensidem cetyltrimetylamonium bromidem (CTAB) v modelu fyziologického roztoku 0,15 M NaCl. Byly studovány vlivy různých pH a výsledné pH různých vzorků hydrogelů. Dále byla sledována stabilita hydrogelů pomocí fluorescenční spektroskopie, kde byl použit pyren jako fluorescenční sonda, a izotermní mikrokolorimetrie. Bylo zjištěno, že nízké teploty narušují integritu gelů a nedoporučuje se vystavení hydrogelů jinému, než neutrálnímu pH.

## **ABSTRACT**

This work studies properties of hydrogels prepared by the interaction of polyelectrolyte hyaluronate with cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) in a model physiological solution of 0,15 M NaCl. Effects of different pH and final pH of different samples of hydrogels were studied. Furthermore, stability of hydrogels was observed by fluorescence spectroscopy, where pyrene was used as a fluorescence probe, and isothermal microcalorimetry. It was found that low temperature disrupts gel integrity and it is not recommended to expose hydrogels to other than a neutral pH.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

fluorescenční spektroskopie, kalorimetrie, hyaluronan, CTAB, interakce, hydrogel, pyren

## **KEYWORDS**

fluorescence spectroscopy, calorimetry, hyaluronan, CTAB, interaction, hydrogel, pyrene

JANČA, D. *Hyaluronanové hydrogely pro medicínské aplikace*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 39 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Tereza Halasová, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

### Poděkování:

Rád bych poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Tereze Halasové, Ph.D. za odborný dohled. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Jitce Krouské, Ph.D. a Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. Všem třem děkuji za cenné rady, komentáře a připomínky.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1.	Gely.....	8
2.1.1.	Vlastnosti gelů .....	8
2.1.2.	Vznik gelů .....	8
2.1.3.	Fyzikálně síťované gely .....	8
2.1.4.	Hydrogely .....	9
2.2.	Tenzidy.....	9
2.2.1.	Struktura tenzidů .....	9
2.2.2.	Druhy tenzidů .....	9
2.2.3.	Agregace a tvorba micel.....	10
2.2.4.	CTAB .....	10
2.3.	Polyelektrolyty.....	11
2.3.1.	Interakce polyelektrolytů s tenzidy .....	11
2.3.2.	Hyaluronan.....	12
2.3.2.1.	Struktura .....	13
2.3.2.2.	Síťování.....	13
2.3.2.3.	Využití.....	14
2.4.	Luminiscence .....	14
2.4.1.	Jabloňského diagram .....	15
2.4.2.	Fluorescence .....	16
2.4.3.	Fluorescenční sondy .....	16
2.4.3.1.	Pyren .....	17
2.5.	Kalorimetrie .....	18
2.5.1.	Kalorimetr .....	18
2.5.2.	Izotermní mikrokolorimetrie (IMC).....	18
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	19
3.1.	Hydrogely a jejich biokompatibilita.....	19
3.2.	Hyaluronanové hydrogely a jejich využití v medicíně.....	19
3.3.	Interakce polyelektrolytu a kationaktivního tenzidu .....	20
4	MATERIÁLY A METODY .....	22
4.1.	Materiály.....	22

4.2.	Metody .....	22
4.2.1.	Příprava vzorků .....	22
4.2.2.	Měření .....	23
4.2.2.1.	Fluorescenční spektroskopie .....	23
4.2.2.2.	Měření pH .....	24
4.2.2.3.	Kalorimetrie .....	25
5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	26
5.1.	Měření pH .....	26
5.2.	Chování komplexů HyA-CTAB v prostředí s různým pH .....	26
5.3.	Měření stability fluorescenční spektroskopii .....	28
5.4.	Kalorimetrické měření hydrogelů .....	32
6	ZÁVĚR .....	35
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	36
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	39
8.1.	Seznam zkratk .....	39
8.2.	Seznam symbolů .....	39

# 1 ÚVOD

Kyselina hyaluronová, dříve naprosto neznámá látka, byla objevena v roce 1934 Karlem Mayerem a Johnem Palmerem. Svého prvního lékařského využití se dočkala až ke konci padesátých let 20. století. Je to přírodní polysacharid, který se nachází ve všech živých organismech. Je zjištěno, že průměrná osoba vážící 70 kilogramů obsahuje 15 gramů této látky a z toho jedna třetina je každý den degradována a opět syntetizována. V dnešní době je kyselina hyaluronová oblastí velkého zájmu vědců. Je totiž skvěle biokompatibilní a nabízí různá využití pro medicínské a farmaceutické aplikace. Je využívána například v kosmetice, tkáňovém inženýrství, oftalmologii, plastické chirurgii a k výrobě obvazů.

Cílem následující práce je prozkoumání hydrogelů, které jsou připravovány pomocí interakce hyaluronanu a tenzidu CTAB v 0,15 M roztoku NaCl, který slouží jako model fyziologického roztoku. Práce obsahuje krátkou rešerši, která pojednává o využitelnosti hyaluronanových hydrogelů a vlastnostech hydrogelů připravovaných pomocí hyaluronanu a kationaktivních tenzidů. Dále studuje vlastnosti hydrogelů na bázi hyaluronanu.

V první části práce byly studovány pH vlastnosti připravovaných hydrogelů. Bylo prozkoumáno pH dvanácti vzorků s různou koncentrací tenzidu a různou koncentrací a molekulovou hmotností hyaluronanu a dále chování těchto hydrogelů v kyselém a zásaditém prostředí. Druhá část byla zaměřena na studium stability vzniklých komplexů pomocí fluorescenční spektroskopie. Jako fluorescenční sonda byl použit pyren. Zkoumány byly dvě sady hydrogelů, které byly skladovány při různých teplotách. Z měřených fluorescenčních spekter byly odečítány hodnoty intenzit prvního a třetího píku a z těchto hodnot stanoven emisní polaritní index, pomocí kterého se stanovuje polarita prostředí. V poslední části byl pozorován vliv, v okolí přirozeně se vyskytujících, mikroorganismů pomocí izotermní mikrokolorimetrie. Bylo sledováno případné metabolické teplo uvolňované mikroorganismy, které se mohly nacházet ve vzorcích.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Gely

Gely jsou koloidně disperzní soustavy, kde disperzní částice tvoří prostorovou síť. Ta je tvořena sítí makromolekulárních řetězců spojených v bodech nazývaných uzly nebo uzlové body. Jestliže se síť vytvoří pomocí fyzikálních sil (Van der Waalsovy, polární síly, vodíkové vazby), jedná se o gely fyzikální a pokud se vytvoří pomocí chemických kovalentních vazeb mezi monomery lineárních polymerů, tak jde o gely chemické. Částice, které tvoří gely, bývají koloidního charakteru. Jejich velikost se pohybuje od jednoho až po tisíc nanometrů [1].

Disperzní prostředí gelů (lyogelů) tvoří nějaké rozpouštědlo. Organické rozpouštědlo obsahují organogely a vodu obsahují hydrogely. Odstraněním rozpouštědla (vysušením) vzniká xerogel. Gely mohou být reversibilní nebo ireversibilní. To znamená, že převedením gelu na xerogel a následným přidáním rozpouštědla se mohou vrátit do původního stavu gelu. Tento proces se nazývá botnání a u některých soustav může být neomezené, tudíž z gelu se stane znovu koloid [1].

#### 2.1.1. Vlastnosti gelů

Gel se chová jako elastické tuhé těleso. Při menších napětích se nedeformují trvale, ale vratně. Elasticita je zajištěna makromolekulární sítí. Některé fyzikální gely mohou pomocí mechanického působení, například protřepání, přejít z gelu na koloidní roztok. Je to způsobeno tím, že mechanické síly naruší fyzikální síly, které poutají prostorovou síť. Pokud necháme koloid v klidu stát, opět se obnoví původní struktura gelu. Tento jev se nazývá tixotropie. Gely jsou také, téměř stejně jako původní koloidní roztok, elektricky vodivé [2].

#### 2.1.2. Vznik gelů

Gely vznikají procesem, který se nazývá gelace. Ten může být uskutečněn fyzikálním nebo chemickým zesíťováním, případně botnáním xerogelu. Dochází přitom k vytvoření trojrozměrné síťovité struktury, ve které se monomerní jednotky spojují v uzlech. Tato práce je zaměřena na fyzikálně vázané hydrogely [2].

#### 2.1.3. Fyzikálně síťované gely

Vznikají sdružováním makromolekulárních řetězců fyzikálními silami do útvarů, které fungují jako uzly, nebo spíše uzlové oblasti, protože jsou mnohem větší, než kovalentní uzly. Uzlové oblasti mohou vznikat někdy asociací částí řetězců nebo jindy nedokonalou fázovou separací. Uzlů v těchto gelech je tedy několik typů, které se mohou lišit strukturou, životností, pevností a velikostí. Na tomto pak závisí chování těchto gelů, zvláště reologické. Gely pak mohou být silné, které mají pevné spoje a jsou podobné gelům kovalentním a slabé, které jsou elastické pouze při malých napětích [2].

Pokud vzniká síť, která je tvořená spoji o dlouhé životnosti, tak znesnadňuje přeskupování řetězců a tudíž i zdokonalování struktury. Dochází ovšem k samovolné reorganizaci, která snižuje Gibbsovu energii. Tento jev se nazývá zrání gelu. Pokud zrání ovšem vede ke zvýšení počtu uzlů, snižuje tím botnavost a gel snižuje svůj objem a vyloučí nadbytečnou část rozpouštědla (synerze) [2].



#### 2.1.4. Hydrogely

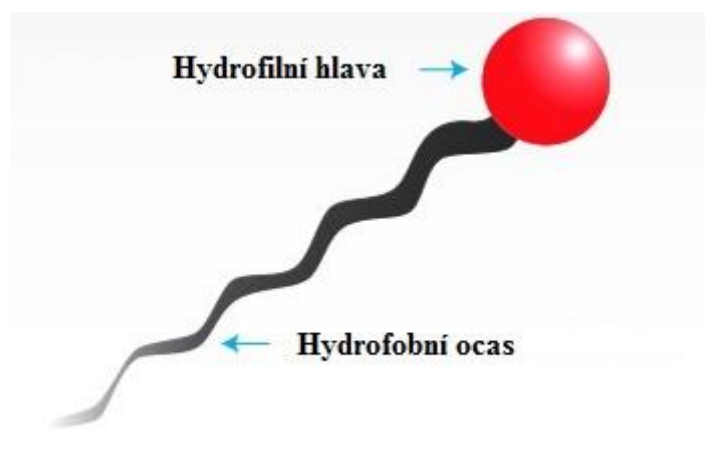
Hydrogel je odborně definován jako dvou nebo více složková soustava prostorové sítě polymerních řetězců a vody, která vyplňuje místo mezi makromolekulami [3]. V závislosti na složení může zadržovat různé množství vody. Přirozeně se vyskytují jako polymerní sítě kolagenu nebo želatiny, nebo mohou být uměle syntetizovány [4]. Jsou to velice slibné biomateriály, které při kontaktu s krví, tělními tekutinami a tkání projevují dobrou biokompatibilitu. Hydrogely mají největší využití v biomedicíně. Jsou běžně používány například pro výrobu kontaktních čoček, superabsorbentů, nosičů léčiv a obvazů [5].

### 2.2. Tenzidy

Tenzidy jsou povrchově aktivní organické látky, které snižují povrchové napětí. Hromadí se na fázovém rozhraní, čímž snižují mezifázovou energii soustavy [6]. V tomto rozhraní se můžou tenzidy hromadit pouze do jeho nasycení. Následně začnou pak agregovat v roztoku a tvořit micely nebo složitější agregáty. Velikost kritické micelární koncentrace závisí na struktuře tenzidu i na charakteru obou fází [7]. Jsou používány jako nosiče léčiv a detergenty.

#### 2.2.1. Struktura tenzidů

Tenzidy mají takzvanou amfifilní strukturu. Tato struktura je bipolární, tzn. obsahuje nejméně dvě části. Jedna část je hydrofobní, nepolární a druhá je hydrofilní, polární [7]. Základní struktura tenzidu je zobrazena na obr. 1.



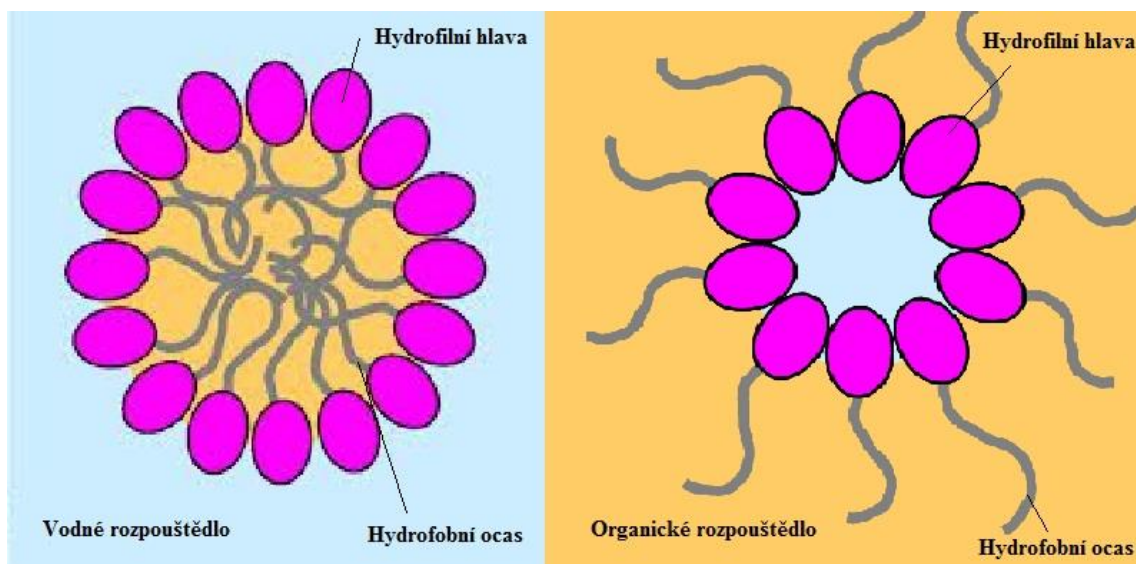
Obr. 1: Struktura tenzidu

#### 2.2.2. Druhy tenzidů

Tenzidy se podle náboje na polární hlavě dělí na anionaktivní, kationaktivní, amfoterní a neionické. Amfoterní tenzidy obsahují v polární hlavě jak kladný, tak záporný náboj. Jejich výsledný náboj závisí na pH. Tato práce se zaměřuje na kationaktivní tenzidy. Většina kationaktivních tenzidů je založena na dusíkovém atomu, který nese kladný náboj a tvoří amino a kvarterní amoniové skupiny. Kvarterní amoniové sloučeniny nejsou pH senzitivní na rozdíl od aminů, které nemohou být použity při vysokém pH. Jejich biologická degradace je oproti anionaktivním tenzidům obecně horší. Nemohou se kombinovat zároveň s anionaktivními tenzidy, protože by se vysrážely. Mají také mikrobicidní účinek, díky kterému našly využití například jako pesticidy. Jsou používány jako složka do aviváží a kondicionérů [6].

### 2.2.3. Agregace a tvorba micel

Další vlastnost tensidů je jejich agregace v roztoku. Je to důsledek toho, že tensidy už se dále nehromadí na mezifázovém rozhraní a vzhledem k jejich bipolárnímu charakteru se snaží snížit energii systému, například zrušením kontaktu hydrofobních skupin s vodou. Vzniklé útvary se nazývají micely a jejich charakter závisí na okolním prostředí. Koncentrace tensidů, při které se začínají tvořit micely, se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC) [7].

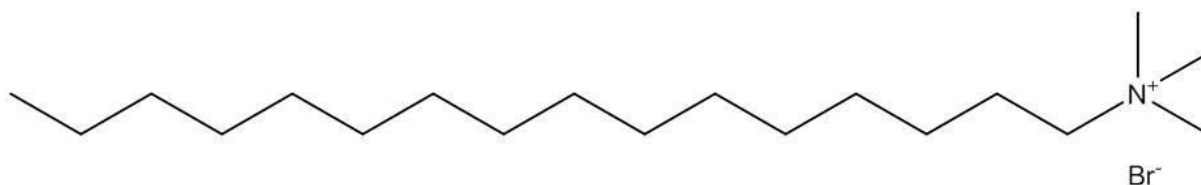


Obr. 2: Schéma micely tvořené tensidy ve vodném roztoku (vlevo) a v organickém rozpouštědle (vpravo).

Micela je koloidní částice. Je tvořena z povrchově aktivních látek tak, aby interakce s okolním rozpouštědlem byla energeticky výhodná. Ve vodném prostředí je povrch micely hydrofilní a v organickém rozpouštědle se tvoří inverzní micely, tedy micely s opačným uspořádáním (obr. 2). Ve zředěných vodných roztocích vznikají micely jako přibližně kulovité tzv. Hartleyovy micely. S rostoucí koncentrací se uhlovodíkové řetězce povrchově aktivních látek orientují čím dál více navzájem rovnoběžně a vznikají tak válcové až laminární tzv. McBainovy micely. Micelární roztoky dokáží rozpouštět látky v čistém disperzním prostředí nerozpustné. Tato vlastnost se nazývá solubilizace. Nepochopitelné látky se rozpouštějí v micelách. Polární látky se rozpouštějí na povrchu micel nebo v jeho blízkosti. Bipolární látky se rozpouštějí tak, že polární část směřuje do polárního rozpouštědla a nepolární do jádra micely [1].

### 2.2.4. CTAB

Cetyltrimetylamonium bromid (CTAB), jehož molekula je zobrazena na obr. 3, je kationaktivní tensid, jehož polární hlavu tvoří kvarterní amoniiová sloučenina. Jako ostatní tensidy této skupiny má mikrobicidní účinky a je efektivním antiseptickým činidlem proti mikroorganismům, například bakteriím. Je rozpustný ve vodě. Nepochopitelné část je tvořena řetězcem z 16 uhlíků. Stejně jako ostatní tensidy i CTAB tvoří micely. Používá se například k separaci a čištění DNA [8].

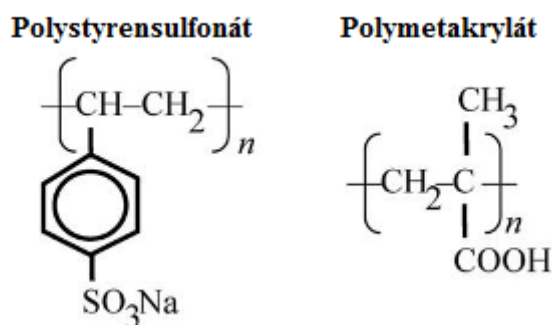


Obr. 3: Struktura CTAB

## 2.3. Polyelektrolyty

Polyelektrolyty jsou polymery, které obsahují ionizovatelné skupiny. V polárních rozpouštědlech tyto skupiny disociují a vznikají tak makrokationy nebo makroaniony. Touto disociací také vznikají protiiony, které tvoří opačný náboj v roztoku. Vlastnosti polyelektrolytů závisí hlavně na koncentraci polyelektrolytu. Polyelektrolytické roztoky se díky elektrostatickým interakcím chovají odlišně od samotných neutrálních polymerů. U neutrálních řetězců dochází k síťování při vyšších koncentracích, než u nabitých. Osmotický tlak polyelektrolytů je vyšší, než u neutrálních polymerů. Viskozita projevuje jinou závislost na koncentraci [2], [9].

Příkladem polyelektrolytů jsou například (obr. 4) polyakrylová a polymetakrylová kyselina a polystyrensulfonyl sodný [9].



Obr. 4: Polyelektrolyty polystyrensulfonyl sodný a polymetakrylová kyselina

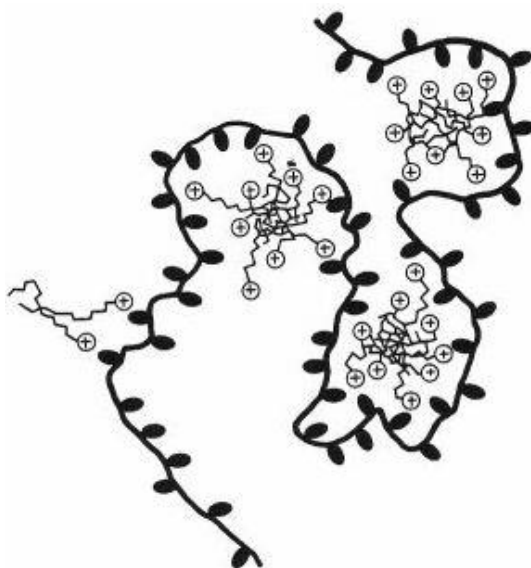
Kromě makroanionů a makrokationů existuje ještě skupina polyamfolytů, kdy řetězec nese jak anionové tak kationové skupiny. Patří mezi ně například proteiny a nukleové kyseliny. Jejich náboj je závislý na pH. Při určitém pH může molekula působit navenek jako neutrální. Hodnota tohoto pH se nazývá izoelektrický bod [2].

### 2.3.1. Interakce polyelektrolytů s tenzidy

Polyelektrolyty, neboli polyiony, obsahují ve své struktuře mnoho nabitých skupin. Pokud se tyto polyiony setkají s nabitými tenzidy, které obsahují opačný náboj, vznikají stabilní komplexy. Jejich příklad je znázorněn na obr. 5. Tyto komplexy jsou schopné různých modifikací co se vlastností a struktury týče. Díky tomuto vyvolaly velký zájem z hlediska využití ve farmacii a biomedicině [10]. Interakce polyelektrolytů s opačně nabitými koloidními částicemi se vyskytují přirozeně v biologických systémech například pro znehybnění enzymů v polyelektrolytických komplexech [11].

Vlastnosti polyelektrolytů jsou velmi důležité pro interakci s tenzidy. Řadí se mezi ně chemické složení, lineární hustota a pozice náboje a dynamika kostry polymeru. Při tvorbě

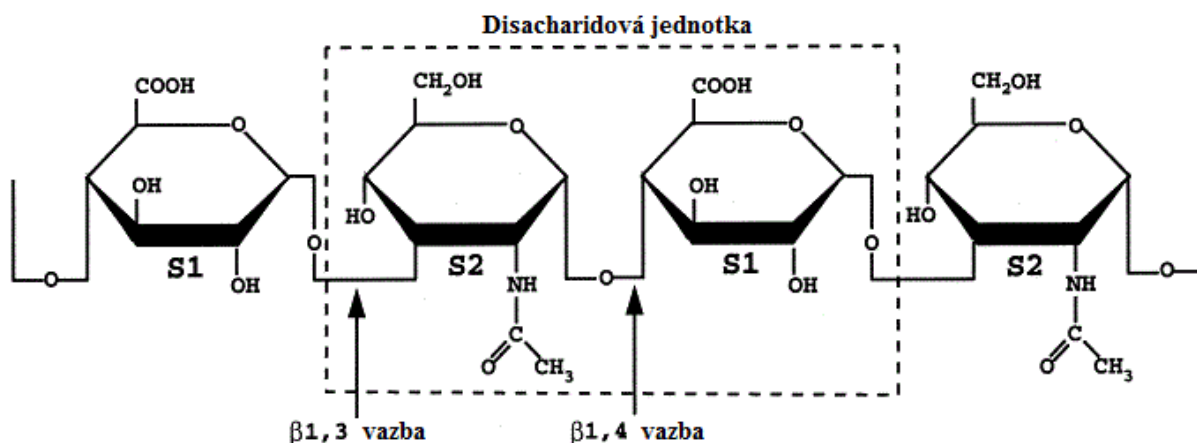
těchto komplexů působí různé interakce. Elektrostatické interakce jsou v tomto případě dominantní a hydrofobní síly se zde uplatňují méně. Tyto komplexy se tvoří samovolně již při velice nízkých koncentracích tenzidu. Při zvyšování a dosažení určité koncentrace dochází k tvorbě micel vázaných na strukturu polyionu. Tato koncentrace se nazývá kritická agregační koncentrace. Při dalším zvyšování koncentrace dochází k tvorbě volných micel a složitějších agregátů v roztoku. Tvorba těchto komplexů je ovlivněna jejich prostředím. Například přidáním soli můžeme ovlivnit velikost CMC. Sůl totiž způsobuje snížení afinity tenzidů k polyelektrolytům a podporuje kooperativní interakce tenzidů, které následně tvoří micely [11].



Obr. 5: Polyelektrolyt-tenzidový komplex ve zředěných systémech – náhrdelníkový model.

### 2.3.2. Hyaluronan

Hyaluronan je vysokomolekulární polysacharid, který se skládá z opakujících se disacharidových jednotek N-acetyl-D-glukosaminu a D-glukuronové kyseliny vázaných  $\beta$ -1-3 a  $\beta$ -1-4 glykosidickou vazbou (obr. 6). Jeho molekulární hmotnost je řádově přibližně  $10^5$  až  $10^7$  Da. Díky ní hyaluronan tvoří velmi viskózní roztoky i při malých koncentracích [11].



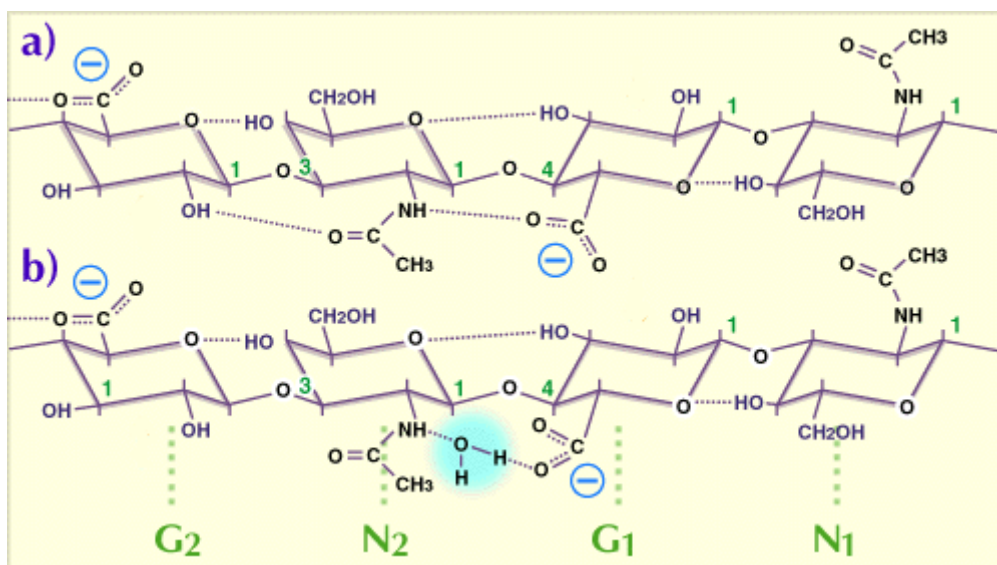
Obr. 6: Základní struktura hyaluronanu obsahujícího  $\beta$ -1-3 a  $\beta$ -1-4 glykosidické vazby.

Hyaluronan se přirozeně vyskytuje jako součást extracelulární matrix buněk u všech obratlovců. U člověka se vyskytuje například v oku, v synoviální tekutině nebo v kůži. Je získáván extrakcí z pupečních šňůr, kohoutích hřebínků, nebo ve větším množství fermentací bakterií. V těle je odbouráván enzymem hyaluronidázou, nebo reaktivními kyslíkatými meziprodukty v místě zánětů [12].

### 2.3.2.1. Struktura

Primární strukturu hyaluronanu (obr. 7) tvoří disacharidové jednotky spojené  $\beta$ -1-3 a  $\beta$ -1-4 glykosidickými vazbami [14]. Tento řetězec obsahuje dva druhy vazeb. Jeden druh jsou vazby v sacharidových jednotkách, které jsou poměrně stálé a udržují jejich přibližně stabilní tvar. Druhý typ jsou glykosidické vazby mezi těmito pevnými jednotkami. Zahrnují atom kyslíku, který poskytuje dvě vazby, navzájem ve tvaru písmene V. Substituenty na konci těchto vazeb jsou schopné rotovat v  $360^\circ$ . Bylo ale prokázáno, že existuje pouze několik možných konfigurací, které substituenty na těchto vazbách zaujímají a pokud vezmeme v potaz počet vazeb v takovém dlouhém řetězci, dostaneme obrovský počet možných tvarů jedné molekuly. Každá molekula obsahuje vodíkové můstky, které stabilizují vazby, mezi vedlejšími sacharidovými jednotkami. V každé tetrasacharidové jednotce jich je přítomno pět [15].

Sekundární strukturu tvoří dvojnásobný řetězec, neboli two-fold helix [15].



Obr. 7: Tetrasacharidová jednotka hyaluronového řetězce. Tečkovaná čára zobrazuje vodíkové můstky. G je glukonát a N je N-acetylglucosamin. Na obrázku je zobrazen rozdíl mezi hyaluronanem ve vodném prostředí (b), kde se tvoří mezi karboxylovou a acetylovou skupinou vodný můstek, a v bezvodém prostředí, kde je vodíkový můstek.

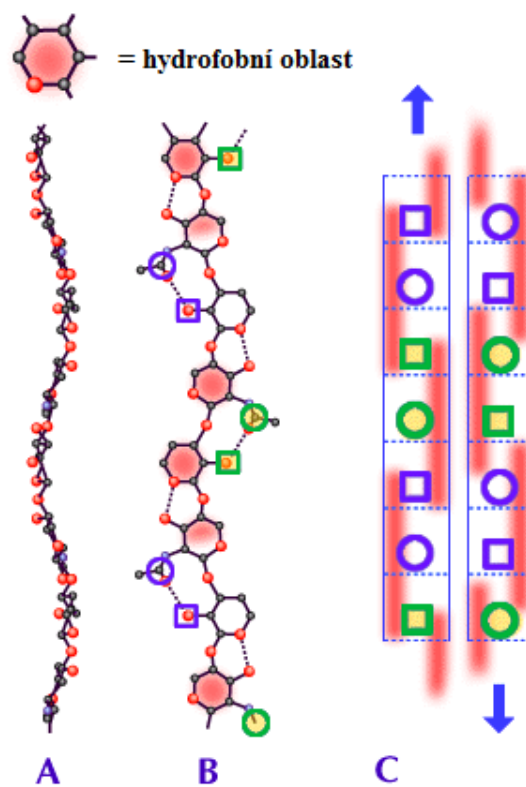
Při neutrálním pH jsou karboxylové skupiny ionizovány a hyaluronan tvoří polyanion. K udržení neutrality k sobě iontově váže protiionové kationy, například sodný kation [14].

### 2.3.2.2. Sítování

Hyaluronan agreguje sám se sebou. Tomuto procesu částečně napomáhají vazby mezi hydrofobními oblastmi. Sekundární struktura má zajímavé vlastnosti. Vznikají totiž dvojnásobné řetězce, které jsou identické, ale zároveň jsou antiparalelní. Agregáty mohou růst na obě strany. Sekundární struktura je znázorněna na obr. 8. Vzhledem k tomu, že oba řetězce



jsou polyaniony, vzniká mezi nimi silná elektrostatická repulze, což by vedlo k disociaci těchto agregátů. Tato síla je ovšem vyvážena nejenom hydrofobními interakcemi, ale i vodíkovými můstky, které vznikají mezi karboxylovými a acetamidovými skupinami [15].



Obr. 8: Na obrázku A a B je znázorněna molekula hyaluronanu. Hydrofobní oblasti jsou značeny jako červené oblasti. Čtverce představují karboxylové a kruhy acetamidové skupiny. Na obrázku C je znázorněna možnost dvojnásobného antiparalelního řetězce hyaluronanu.

### 2.3.2.3. Využití

Díky svým vlastnostem nabízí hyaluronan široká využití v oborech biomedicíny a farmacie. Mezi tyto vlastnosti patří jeho vysoká hygroskopicitá, viskoelasticitá, skvělá biokompatibilita, degradace na bezpečné produkty a také nevyvolává reakci imunitního systému. Pro využití se hyaluronan musí upravovat. Nemodifikovaný hyaluronan je totiž rychle odbouráván v těle. Podléhá enzymatické degradaci enzymem hyaluronidázou [13].

Hyaluronan se využívá v tkáňovém inženýrství, v oftalmologii, plastické chirurgii a při léčbě osteoartrózy. Díky svým hydratačním vlastnostem je úspěšně používán v kosmetice například pro zjemnění kůže. Z hyaluronanových hydrogelů se vyrábějí obvazy, které urychlují léčící proces. Dá se také využít ve farmacii jako nosič léčiv [16].

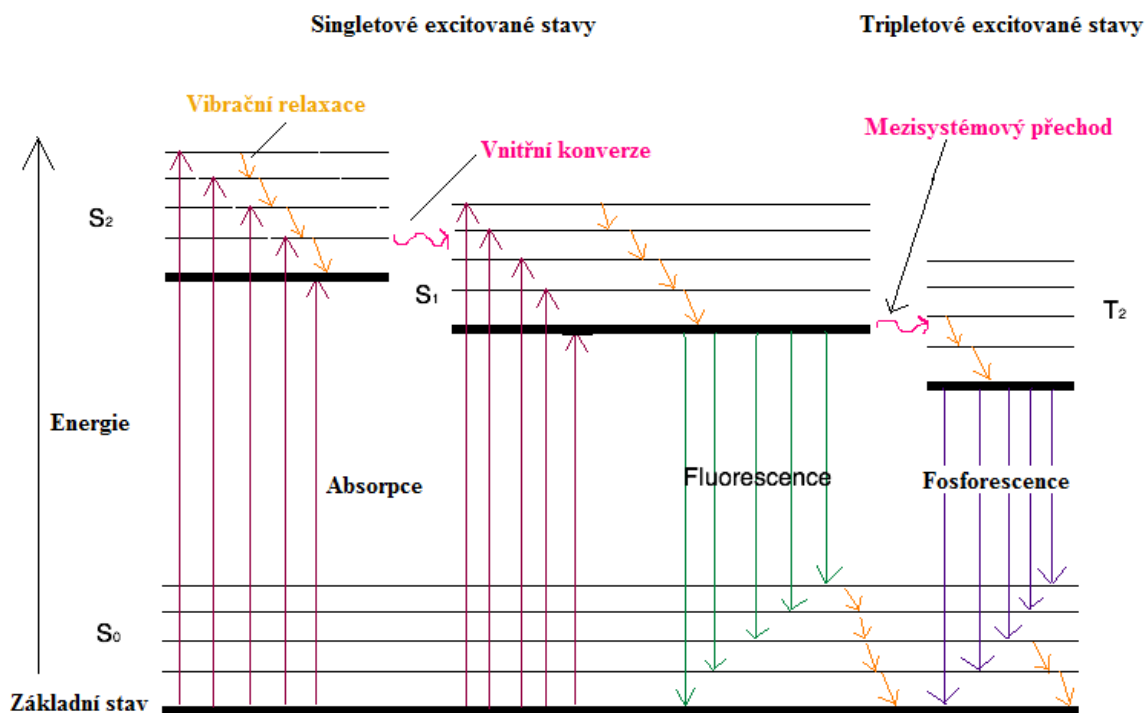
## 2.4. Luminiscence

Luminiscence je jev, kdy dochází k vyzáření světla nějakou látkou po její excitaci. Emisní záření může setrvat i po skončení excitačního účinku. Excitace může být provedena různými způsoby, podle kterých se pak i luminiscence rozděluje. V nejhlavnějších případech dochází k excitaci chemickou reakcí, pak se jedná o chemiluminiscenci, v případě elektrického proudu jde o elektroluminiscenci a při excitaci elektromagnetickým zářením o fotoluminiscenci. Fotoluminiscence se rozděluje podle energetické hladiny, ze které probíhá deexcitace, na

deexcitaci ze singletové hladiny, neboli fluorescence, která je krátkodobá (zlomky sekund), a deexcitace z tripletové hladiny, neboli fosforescence, která je dlouhodobá (sekundy až hodiny). K excitaci může docházet i například mechanickým vlivem, teplem, ozářením [17].

### 2.4.1. Jabloňského diagram

Při fotoluminiscenci dochází k excitaci látky elektromagnetickým zářením. Tento jev doprovází jak zářivé tak nezářivé přechody, které probíhají při deexcitaci a jsou většinou znázorňovány pomocí Jabloňského diagramu (obr. 9) [18].



Obr. 9: Jabloňského diagram znázorňuje energetické přechody při fotoluminiscenci. Šipky nahoru ukazují absorpci. Oranžové šipky znázorňují vibrační relaxaci, růžové šipky vnitřní konverzi a mezisystémový přechod. Dva zářivé deexcitační přechody, fluorescence a fosforescence, jsou zaznačeny šipkami dolů.

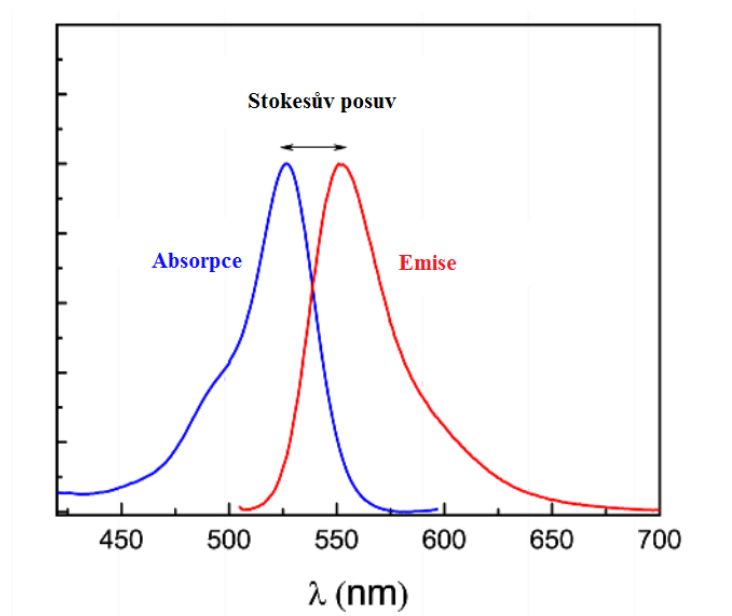
Nejdříve dochází k jevu zvanému absorpce. Tento jev trvá přibližně  $10^{-15}$  sekundy. Dochází při ní k excitaci elektronu fotonem ze základního stavu do vyšší energetické hladiny. Excitovat mohou pouze určité vlnové délky světla, které záleží na struktuře dané molekuly. Každý stav, ať už singletový  $S_1$ ,  $S_2$  nebo tripletový  $T_1$ ,  $T_2$ , má více vibračně rotačních energetických hladin. Těchto hladin je mnoho, proto je v diagramu z důvodu přehlednosti uvedeno pouze několik z nich. Po excitaci elektronu tento elektron postupně přechází na nižší vibrační hladiny. Tento proces je nezářivý a říká se mu vibrační relaxace. Pokud elektron dosáhne určité energetické hladiny, která je shodná s jinou hladinou např. ve stavu  $S_1$ , může přejít do jiného stavu například z  $S_2$  na  $S_1$  na stejnou energetickou hladinu. Tento druhý nezářivý proces se nazývá vnitřní konverze. Elektron v  $S_1$  přechází na nižší energetické hladiny a pak může dojít k prvnímu zářivému přechodu, fluorescenci, nebo opět k nezářivému mezisystémovému přechodu, jehož doba je o několik řádů větší, než u fluorescence. Tento přechod patří mezi zakázané přechody. Elektron totiž přechází ze singletového do

tripletového stavu za změny spinu. Zde může dojít k druhému zářivému procesu, fosforescenci, dalšímu zakázanému přechodu, kdy dochází k deexcitaci elektronu z tripletového do základního singletového stavu [18].

#### 2.4.2. Fluorescence

Při deexcitaci se elektron může zbavit energie několika způsoby. Jedním z nich je emise fotonu. Fluorescence je jev, kdy dochází k emisi fotonu při deexcitaci ze singletového stavu do jedné z energetických hladin základního stavu. Zde se uplatňuje Kashovo pravidlo, které říká, že před emisí dochází nejprve k vibrační relaxaci a vnitřní konverzi, což znamená, že k excitaci dochází z nejnižší vibrační hladiny excitovaného stavu  $S_1$  [19].

Energie fotonu je menší, než energie absorbovaná, protože se po absorpci část energie ztratí při vibrační relaxaci a vnitřní konverzi. Díky ztrátě této energie dochází k posuvu fluorescenčního spektra oproti absorpčnímu [18]. Spektra jsou téměř zrcadlově symetrická u velkého množství organických molekul. Tento posun se nazývá Stokesův posuv (obr. 10) [19].



Obr. 10: Stokesův posuv

Látky, které fluoreskují, se nazývají fluorofory. Intenzivní fluorescenci vykazují některé aromatické nebo heterocyklické uhlovodíky, například chinin, fluorescein a rhodamin B [19].

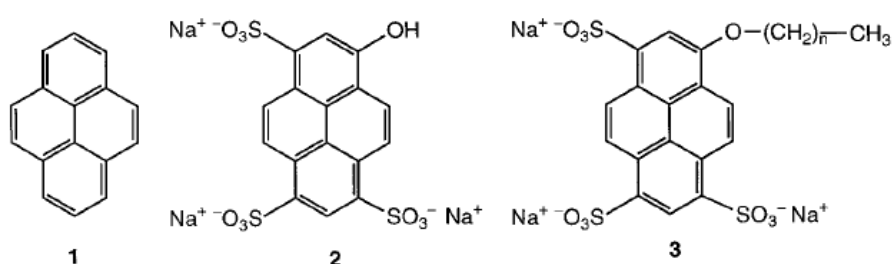
U fluorescence může být její kvantový výtěžek, což je poměr světelných kvant emitovaných a absorbovaných za sekundu, snížen dějem, který se nazývá zhášení fluorescence. Jde o bimolekulární proces, který se odehrává různými způsoby. Dynamické zhášení nastává při srážce fluoroforu se zhášedčem. Statické zhášení nastává, když molekula zhášedce a fluoroforu vytvoří nefluoreskující komplex. Poslední proces je samozhášení, které nastává při vysoké koncentraci fluoroforu [19].

#### 2.4.3. Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou fluorescenční molekuly, které se využívají ke studii různých fyzikálně chemických, biochemických a biologických systémů. Pomocí nich se dají získat



různé informace z různých oblastí. Tyto sondy lze rozdělit do tří skupin, a to vnitřní, vnější kovalentně vázané a vnější asociující sondy. Vnitřní sondy jsou součástí zkoumaných molekul. Kovalentně vázané jsou sondy, které se váží ke zkoumaným molekulám, například k tenzidům, proteinům, fosfolipidům a polymerním řetězcům. Asociující sondy se váží nekovalentně ke zkoumaným molekulám. Pomocí této třetí skupiny jsou nejvíce uskutečňovány průzkumy kvůli obtížné syntéze molekul s kovalentně vázanými sondami. Vnitřní sondy jsou sice ideální, ale je jich málo. Mezi fluorescenční sondy (obr. 11) patří například pyren, trisodná sůl kyseliny 8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonové a trisodná sůl kyseliny 8-alkoxypyren-1,3,6-trisulfonové [20].

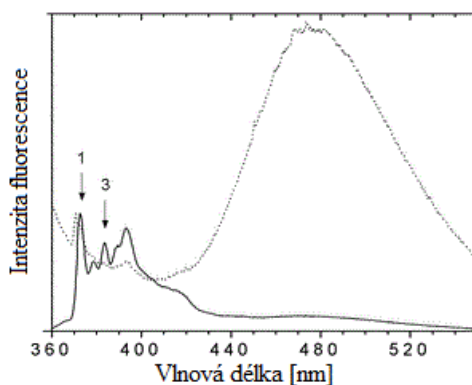


Obr. 11: Příklady fluorescenčních sond: hydrofobní pyren (1), hydrofilní trisodná sůl kyseliny 8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonové (2) a amfifilní trisodná sůl kyseliny 8-alkoxypyren-1,3,6-trisulfonové (3).

Rozpuštěnost a interakce vnějších sond v daném prostředí jsou řízeny jejich chemickým charakterem. Důležitým kritériem vnějších sond je hydrofobní, hydrofilní a amfifilní charakter. Pro použití sondy je velmi důležité kritérium její senzitivita vůči vlastnostem prostředí, ve kterém se nachází (kyselost, polarita a další) [20].

#### 2.4.3.1. Pyren

Pyren je aromatická nepolární sloučenina, která se skládá ze čtyř benzenových jader a je citlivá na polaritu svého okolí. Je jednou z nejpoužívanějších fluorescenčních sond. Fluorescenční spektrum pyrenu (obr. 12) je vibračně rozlišeno a má pět piků. Jeho excitační maximum je přibližně při 335 nm. Vzhledem k jeho polaritě se ve vodném prostředí rozpouští v jádrech micel [20].



Obr. 12: Emisní spektrum pyrenu je znázorněno plnou čarou. Tečkovanou čarou je znázorněno emisní spektrum excimeru, jehož maximum je přibližně při 480 nm.

Pyren je schopen tvořit excimer, což je excitovaný dimer. Vzniká tvorbou komplexu jedné excitované a jedné molekuly pyrenu v základním stavu. Tvorbou tohoto komplexu dochází ke změně struktury pyrenu a posunutí jeho emisního spektra [17].

Poměr intenzity prvního a třetího píku, které jsou při 372 nm a 383 nm, slouží k určování polarizace jeho prostředí. Tento poměr se nazývá emisní polaritní index (EmPI). Se zvyšováním koncentrace tenzidů dochází ke snižování tohoto poměru, což indikuje i snižování polarizace prostředí. Po dosažení kritické micelární koncentrace a při vyšší koncentraci je poměr přibližně konstantní, což ukazuje na zabudování pyrenu do hydrofobního prostoru micel [21].

## **2.5. Kalorimetrie**

Kalorimetrie se zabývá měřením tepla a dalších termofyzikálních vlastností, například tepelné kapacity, daného systému při chemickém, fyzikálním nebo biologickém ději. Ke kalorimetrickému měření se používá kalorimetr. Existuje velká řada kalorimetrů, které mají různá využití [22].

### **2.5.1. Kalorimetr**

Kalorimetr slouží primárně k experimentálnímu určení tepla a tepelné kapacity. Podle podmínek, za kterých kalorimetr může pracovat, existují dva jeho základní typy, a to adiabatický a izotermní [22].

V adiabatických kalorimetrech se při pozorovaném ději veškeré teplo spotřebuje k ohřátí, nebo ochlazení kalorimetru a jeho obsahu. U tohoto typu se měří rozdíly teplot mezi vzorkem a okolím [22].

U izotermních kalorimetrů je veškeré uvolněné nebo spotřebované teplo odvedeno a teplota zůstává konstantní. Odváděné teplo poté může být kompenzováno například elektricky [22].

### **2.5.2. Izotermní mikrokcalorimetrie (IMC)**

Izotermní mikrokcalorimetrie je analytická metoda, která umožňuje měřit produkci tepla, v řádu mikrowattů, malých množství vzorků, přibližně od jednoho gramu nebo mililitru. Vzhledem k tomu, že všechny chemické nebo fyzikální procesy produkují nebo spotřebovávají teplo, může pomocí této metody sledovat jejich průběh. Tato metoda se dá použít i při mikrobiologických studiích. Zde můžeme v reálném čase pozorovat mikrobiální metabolické teplo produkované bakteriemi, které se nachází ve vzorku společně s živným médiem [23].

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

#### 3.1. Hydrogely a jejich biokompatibilita

Hydrogely jsou vědci studovány již několik desítek let. Jedním z důvodů, proč jsou tolik studované, je jejich velký potenciál využití v medicíně. Jsou obecně biokompatibilní, a proto jsou velmi slibným materiálem pro různé aplikace. Tato vlastnost je velmi důležitá, protože by mohlo dojít k nežádoucí imunitní odezvě organismu a poškození buněk. Byly zkoumány jak přírodní tak syntetické hydrogely například jako nosiče buněk, léčiv nebo jako matrice v oblasti tkáňového inženýrství pro regeneraci různých tkání a orgánů [24].

Vědci se také zabývají studiem hydrogelů pro využití jako obvazů ran. Za ideální obvaz je považována samotná kůže. Proto je snaha vyvinout materiál, který obsahuje 85% vody a je prodyšný. Tento materiál kromě biokompatibility musí být dostatečně pevný a přilnavý, aby držel na ráně a nedocházelo k jeho poškození při použití. Jako dobré materiály se ukázaly polysacharidové hydrogely, které vytváří vlhké prostředí pro hojení ran. Mohou být navrženy do různých velikostí a tvarů a tudíž i tak, aby byly prodyšné pro plyny a nepropouštěly mikroorganismy. **Singh B. a spol.** [25] se zabývali studiem právě těchto hydrogelů. Studovali hydrogely na bázi polyvinylalkoholu (PVA) a PVA s polyakrylamidem (PVA-AAm) s přídavkem antibiotik tetracyklinu a baktericidního gentamicinu pro jejich pomalé uvolňování. Studovali též jejich krevní kompatibilitu, přilnavost, mechanickou sílu, propustnost vodní páry, kyslíku, mikrobů a antimikrobiální vlastnosti. Využili k tomu rastrovací elektronový mikroskop (SEM), Fourierovu infračervenou spektroskopii (FTIR), tepelnou gravimetrickou analýzu (TGA). Výsledky ukázaly, že tyto materiály jsou prodyšné pro vodní páru a kyslík, ale nepropustné pro mikroorganismy. Jsou také mechanicky odolné a biokompatibilní. Ukázalo se, že mohou být aplikovány v jakékoliv fázi poranění a že přidané látky podporovali hojení. Ukázaly se tudíž jako slibný biomateriál pro obvazy na hojení ran a potvrzují původní myšlenku, že polysacharidové hydrogely jsou pro toto využití velmi vhodné.

#### 3.2. Hyaluronanové hydrogely a jejich využití v medicíně

Hyaluronan, neboli sůl kyseliny hyaluronové, je polysacharid také používaný pro výrobu hydrogelů. Je skvěle biokompatibilní, neboť se vyskytuje přirozeně v lidském organismu například v kůži, pojivových tkáních nebo oku [13]. Je už několik desetiletí klinicky využíván pro léčbu osteoartritidy, očních zánětů nebo v kosmetice. Jeho využití bylo dříve omezené, protože se získával z kohoutích hřebínků a pupečních šňůr. Dnes je ve velkém množství produkován hlavně fermentací bakterií [26]. Biologické vlastnosti závisí na molekulární hmotnosti HyA. Vysokomolekulární HyA (>100kDa) má protiangiogenní a protizánětlivé účinky. HyA s nižší molekulovou vahou má opačný biologický účinek [27].

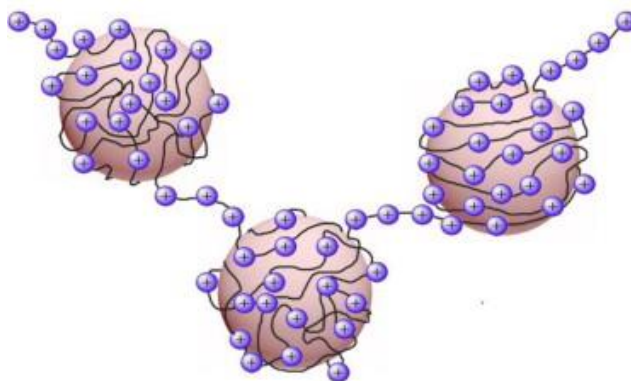
Jedním z dalších možných využití hyaluronanu je jako nosič léčiv. Pro získání dobrého nosiče na bázi hyaluronanu, s optimálním uvolňováním léčiv, bylo zkoumáno jeho mnoho různých chemických modifikací upravováním jeho funkčních skupin. **Vasi A. a spol.** [27] zkoumali funkční hyaluronanové deriváty, které byly získány pomocí otevíracího mechanismu maleinanhydridu. Pro jejich charakterizaci byly použity SEM, FTIR a protonovou nukleární magnetickou rezonanci (<sup>1</sup>H NMR) a TGA. Vzniklé gely byly získány kopolymerací s kyselinou akrylovou (AA) za použití iniciačního redoxního systému a pro

studování uvolňování bylo použito modelové oftalmologické léčivo pilokarpin. Při in vitro testech se ukázalo, že klíčovou roli hrají velikosti pórů hydrogelu pro vkládání a uvolňování léčiva. Za jeden a půl dne se uvolnilo 60% léčiva. Úplného uvolnění je dosaženo zároveň s degradací hydrogelu, což ukazuje na možnost použití pro kontrolované uvolňování léčiv. Též byla prokázána biokompatibilita hydrogelu. HyA hydrogely mají tudíž rozhodně potenciál pro budoucí využití v praxi jako cílená léčiva.

### 3.3. Interakce polyelektrolytu a kationaktivního tenzidu

Výzkumem interakce polyelektrolytu a opačně nabitého tenzidu ve vodném roztoku se v posledních desetiletích zabývalo mnoho vědců. Tímto způsobem lze připravit hydrogely, které jsou dnes využívány hodně v průmyslu, potravinářství a ve farmacii. Díky této kombinaci získávají hydrogely speciální vlastnosti, například vylepšenou stabilitu a povrchovou aktivitu. K interakci dochází již při velmi malé koncentraci tenzidu. Je také dokázáno, že micely se v přítomnosti polymeru tvoří již před dosažením kritické micelární koncentrace. Vznik micel v těchto komplexech se dá využít například k rozpuštění hydrofobních látek v hydrogelu [28]. Pro klinické aplikace musí tyto hydrogely být také biokompatibilní a biodegradabilní. Pro toto použití se nabízí právě hyaluronan, neboť má tyto požadované vlastnosti.

Zajímavým způsobem tvorby těchto komplexů se zabývali **Shulevich Y. a spol.** [29]. Zkoumali tyto komplexy získané pomocí templátové polymerizace iontového monomeru v micelárním roztoku opačně nabitého tenzidu. K jejich charakterizaci využili metody DLS, nefelometrie a polyelektrolytové titrace. Jako monomer, který byl syntetizován alkylací, byl použit methakryloyloxyethyl trimethyl amonium methylsulfát v acetonu a jako tenzid byl použit dodecylsulfát sodný (SDS). Výsledné komplexy byly znatelně obohaceny o tenzidové ionty, na rozdíl od komplexů získaných normálním způsobem, a rozpustné ve vodě. Dále se ukázalo, že jsou velice stabilní, ale obsahují ve výsledných makromolekulách (obr. 13) značné defekty, které se tvoří buď při asociaci řetězcových segmentů při polymerizaci, nebo při tvorbě komplexních struktur.



Obr. 13: Pravděpodobná struktura komplexu získaného polymerizací.

Studiem interakcí mezi polyelektrolyty a kationaktivními tenzidy se také zabývala vědecká skupina **Thalberga K.** [30-31]. Jejich práce byla zaměřená na interakce hyaluronanu a kationaktivních tenzidů. Jako kationaktivní tenzidy byly použity alkyltrimethylamonium bromidy, konkrétně alkyly o délce 8, 9, 10, 12, 14 a 16 uhlíků. Pro měření byly využity metody NMR, vodivosti, polarimetrie a solubilizace barviv. Výsledky ukázaly, že je potřeba

určitá minimální koncentrace tenzidu, aby došlo k tvoření komplexů. Při nižší koncentraci dochází pouze k elektrostatickým interakcím mezi opačně nabitými ionty. Při tvorbě komplexů hraje roli délka alkylového řetězce. Pro interakci tenzidu s hyaluronanem by měl mít alespoň 10 uhlíků. Tenzidy s delším alkylovým řetězcem vytvářejí micely vázané k polyanionu a jsou stabilnější. Zkracováním řetězce dochází ke snižování důležitosti elektrostatických sil, zvyšuje se koncentrace elektrolytu v celkovém objemu a jsou energeticky více preferovány volné micely, které jsou větší, než micely vázané k polyanionu. Micely vázané k polyanionu jsou částečně neutralizovány a mají tak nižší hustotu náboje. Síla interakce mezi hyaluronanem a tenzidy se také ukázala, že je mnohem slabší oproti pektátu a alginátu, což je zapříčiněno menší hustotou náboje na hyaluronanovém řetězci. Struktura vzniklých komplexů je popsána, jako navázané „micelle-like“ klastry k polymernímu řetězci a označována jako „pearl-necklace“ model.

Vazba kationaktivního tenzidu k záporně nabitému polyelektrolytu vede ke snížení celkového náboje a hydrofilicity vzniklého komplexu. Díky tomuto, a při určitém stupni navázání, se stává roztok opalescentní. Bod tohoto fázového přechodu není přesně definován, ve studii je brán jako bod, kdy se roztok stal vizuálně opalescentní. Tento bod je závislý na vlastnostech tenzidu, polyelektrolytu a na jejich koncentraci a molekulové hmotnosti.

Zabývali se také vlivem soli při této interakci. Ukázalo se, že přidání soli je analogické s přidáním tenzidu. Přídavek rozpouští sraženiny, snižuje kritickou micelární koncentraci, zvyšuje koncentraci elektrolytu a dochází k větší stabilizaci micel. Na druhou stranu přídavek zvyšuje kritickou agregační koncentraci, což je opačný efekt u CMC a z toho vyplývá, že snižuje sílu interakce mezi polyelektrolytem a tenzidem. Volné micely jsou ovlivněny více, protože jejich náboj není neutralizován polyanionem a jsou větší.

Při podrobnější studii vlivu soli, za použití bromidu sodného a stejných tenzidů a polyelektrolytu, bylo zjištěno, že přídavek soli způsobil zvýšení objemu koncentrované fáze. Tato vysoce viskózní fáze byla vytvořena po smíchání tenzidu a hyaluronanu v soli. Druhá vzniklá fáze, supernatant, byla svojí viskozitou podobná čisté vodě. Bylo zjištěno, že přídavek určité koncentrace soli může úplně potlačit tuto fázovou separaci. Přídavek soli také zvýšil koncentraci tenzidu v koncentrované fázi. Hyaluronan mohl tudíž vázat více tenzidu, ale snížila se síla interakcí.

## 4 MATERIÁLY A METODY

### 4.1. Materiály

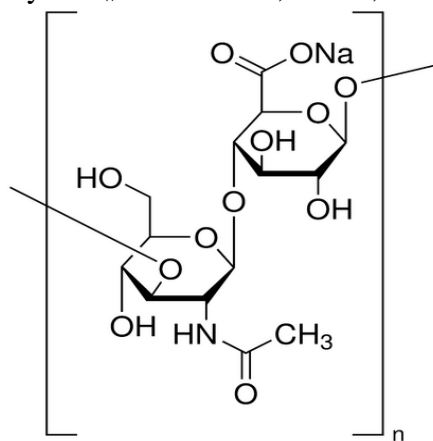
Hyaluronan

HyA  $M_w = 87$  kDa, native, CPN s.r.o., š. 209-073

HyA  $M_w = 458$  kDa, native, CPN s.r.o., š. 213-3809

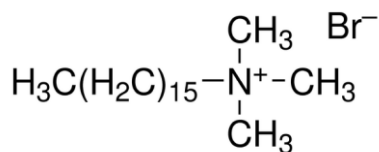
HyA  $M_w = 936$  kDa, native, CPN s.r.o., š. 213-4160

HyA  $M_w = 1800$  kDa, native, CPN s.r.o., š. 211-180



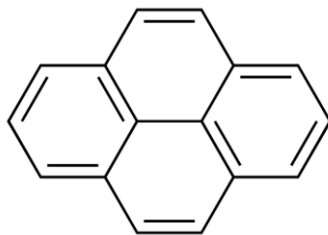
Tenzid

CTAB, cetyltrimethylammonium bromide,  
SERVA Electrophoresis GmbH, š. 200-311-3



Fluorescenční sonda

pyren, puriss. p.a., for fluorescence, Fluka, š. 2049273



Rozpouštědlo

čistá voda, Millipore: Milli-Q

NaCl, chlorid sodný, Lach-Ner s.r.o., š. PP/2009/06278

Chemikálie pro pufr

NaOH, hydroxid sodný, Lach-Ner s.r.o., š. 215-185-5

NaHCO<sub>3</sub>, hydrogenuhličitan sodný, Lach-Ner s.r.o. š. 22-24/25

kyselina octová, Lach-Ner s.r.o., š. PP/2013/03285

octan sodný, Ing. Petr Švec – Penta s.r.o., š. 1801280113

### 4.2. Metody

#### 4.2.1. Příprava vzorků

Byl připraven zásobní roztok pyrenu v těkavém rozpouštědle acetonu o koncentraci  $10^{-4}$  a dále zásobní roztoky tenzidu CTAB o různé koncentraci a hyaluronanu o různé molekulové hmotnosti a hmotnostní koncentraci v 0,15 M roztoku NaCl, který představuje fyziologický

roztok. Pro sledování chování hydrogelu v kyselém a zásaditém prostředí byly připraveny dva pufrы, první, s pH 9,6, z hydroxidu sodného a hydrogenuhličitanu sodného a druhý, s pH 3, z octanu sodného a kyseliny octové. Pro toto sledování byly pufrы použity jako rozpouštědlo pro zásobní roztoky hyaluronanu a CTAB. Roztoky hyaluronanu byly skladovány v lednici a ostatní zásobní roztoky při laboratorní teplotě.

Všechny vzorky byly připraveny podobně. Nejdříve bylo smícháno CTAB s hyaluronanem v poměru 1:1. Poté byly vzorky ponechány 24 hodin v lednici a následně převedeny do centrifugačních zkumavek. Vzniklý hydrogel byl poté odstředěn.

U vzorků měřených fluorescenční spektroskopií byla zásobním roztoku s CTAB rozmíchána fluorescenční sonda pyren, u které bylo před smícháním odpařeno těkavé rozpouštědlo. Koncentrace sondy byla  $10^{-7}$  M.

Tab. 1 Použité vzorky, vzorky 1-12 byly použity pro měření pH, index 2 znázorňuje vzorky použité pro sledování stability fluorescenční spektroskopií, vzorky 13-14 byly využity ke kalorimetrickému sledování a vzorek s indexem 3 k pozorování v kyselém a zásaditém pH.

Vzorek	Koncentrace CTAB (mM)	Hyaluronan w (%)	Hyaluronan $M_w$ (kDa)
1	50	0,5	87
2	200	0,5	87
3	50	2	87
4 <sup>2</sup>	200	2	87
5	50	0,5	458
6	200	0,5	458
7	50	2	458
8 <sup>2</sup>	200	2	458
9	50	0,5	936
10	200	0,5	936
11	50	2	936
12 <sup>2</sup>	200	2	936
13	50	2	1800
14 <sup>3</sup>	200	2	1800

V tabulce 1 jsou ukázány typy vzorků, které byly připraveny. Pro přehlednost budou vzorky dále označovány způsobem 50/0,5(87) (vzorek 1).

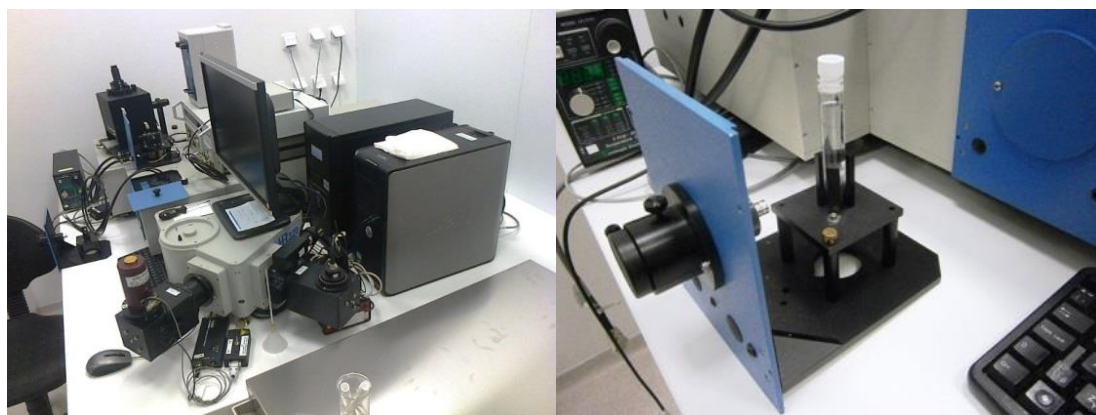
Pro fluorescenční spektroskopii byly připraveny 2 sady vzorů uvedených výše v tabulce 1. Jedna byla skladována při laboratorní teplotě a druhá pro skladování při přibližně 4 °C, neboli teplotě uvnitř ledničky.

#### 4.2.2. Měření

##### 4.2.2.1. Fluorescenční spektroskopie

Pomocí přístroje Fluorolog (obr. 14) byly měřeny vzorky obsahující pyrenovou sondu. Přístroj byl upraven tak, aby vzorky mohly být měřeny přímo ve zkumavkách. Fluorolog odpovídá klasickému spektrofluorimetru. Obsahuje xenonovou lampu, která je zdrojem excitačního záření a monochromátor vybírá specifickou vlnovou délku tohoto záření. To je vedeno dále přes optický kabel a dopadá na vzorek. Druhým optickým kabelem, umístěným vhodně tak, aby byl mezi oběma pravý úhel, je vedeno záření emitované vzorkem do

emisního monochromátoru. Ten vybírá požadované vlnové délky, které následně posílá do detektoru. Výstupem je emisní fluorescenční spektrum.



*Obr. 14: Fluorolog a vzorek uchycený ve stojanu*

Měření bylo provedeno pomocí programu FluorEssence. Program slouží ke kontrole přístroje a zobrazuje naměřená spektra. V nastavení byla volena vlnová excitační délka světla 336 nm. Spektrum bylo měřeno v rozmezí od 360 nm po 500 nm. V programu byly po naměření odečteny hodnoty intenzit píků při  $372 \pm 1$  nm a  $383 \pm 1$  nm a z nich byl vypočítán EmPI. Výpočet je uveden v kapitole 2.4.3.1.

#### **4.2.2.2. Měření pH**

Pro měření pH byl využit přístroj Toledo Mettler Seven Easy, vodivostní pH metr. Před použitím byl pokaždé kalibrován alespoň dvěma pufrů o pH 4,01 a 10,01. Při měření byla elektroda zasunuta do vzorku a byla odečtena ustálená hodnota pH.

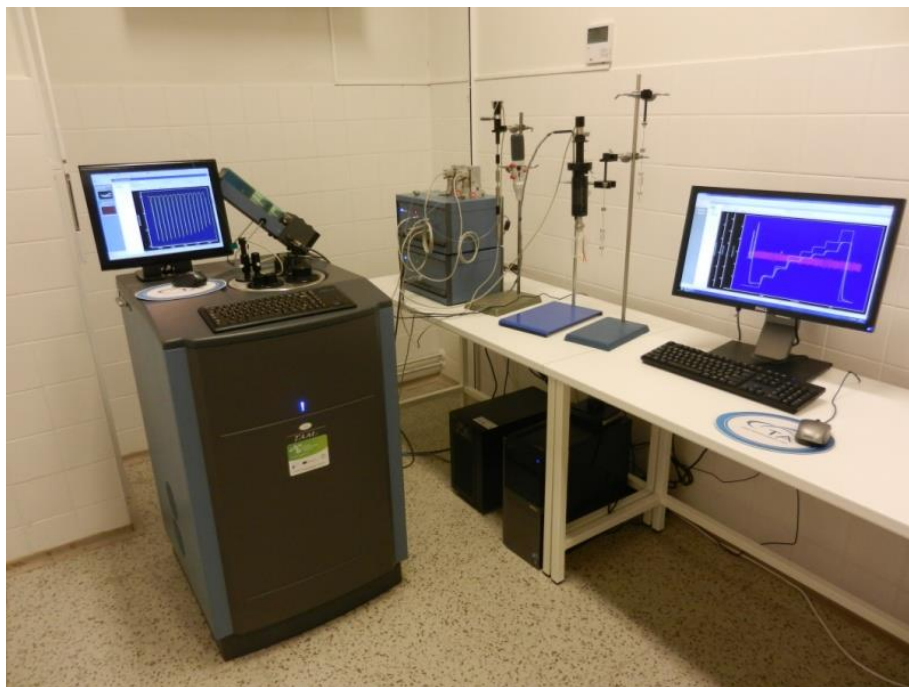


*Obr. 15: pH metr Mettler Toledo Seven Easy*



#### 4.2.2.3. Kalorimetrie

Ke sledování tepelných změn byl využit mikrokalorimetr TAM III (obr. 16). Součástí přístroje je termostát s citlivostí na 0,0001 °C. Pro měření byla nastavena teplota 25 °C a bylo sledováno teplo produkované vzorkem. Vzorky byly v objemu 2 ml přeneseny do měřících ampulí a poté vloženy do přístroje a sledovány alespoň jeden týden. Výstupem je graf závislosti změny tepla v mikrowattech na čase. Princip je popsán v kapitole 2.5.



Obr. 16: Mikrokalorimetr TAM III

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem experimentální části práce je prozkoumat vlastnosti hydrogelů, založených na interakci polyelektrolyt-tenzid, pro případné využití v praxi. Jako polyelektrolyt byl použit hyaluronan a jako modelový tenzid CTAB. Byly prozkoumány vlastnosti, jako pH vzniklých hydrogelů, jejich stabilita, neboli trvanlivost, v čase a různé vlivy prostředí.

### 5.1. Měření pH

V první části práce bylo zkoumáno pH vzniklých hydrogelů interakcí hyaluronanu sodného a kationaktivního tenzidu CTAB v roztoku 0,15 M NaCl. Celkem bylo proměřeno dvanáct vzorků (tab. 1) hydrogelů a jejich supernatantů o různých koncentracích tenzidu, molekulových hmotnostech a hmotnostních koncentracích hyaluronanu. Hodnota pH těchto hydrogelů je jednou z důležitých vlastností pro hodnocení biokompatibility. Vzhledem k tomu, že pH lidské kůže se pohybuje přibližně v rozmezí 4 až 6, mělo by pH hydrogelu být podobné, pokud uvažujeme o kožních aplikacích.

Tab. 2 Výsledky měření pH hydrogelů a jejich supernatantů

Vzorek	pH Hydrogel	pH Supernatant
50/0,5(87)	5,5 ± 0,2	5,7 ± 0,5
200/0,5(87)	5,7 ± 0,2	5,7 ± 0,3
50/2(87)	5,7 ± 0,0	5,8 ± 0,3
200/2(87)	5,6 ± 0,1	5,8 ± 0,3
50/0,5(458)	6,0 ± 0,2	6,0 ± 0,4
200/0,5(458)	6,0 ± 0,0	6,1 ± 0,4
50/2(458)	5,9 ± 0,1	5,9 ± 0,1
200/2(458)	5,9 ± 0,1	5,9 ± 0,1
50/0,5(936)	5,9 ± 0,1	6,0 ± 0,2
200/0,5(936)	6,0 ± 0,0	6,0 ± 0,2
50/2(936)	6,1 ± 0,1	6,1 ± 0,1
200/2(936)	6,2 ± 0,1	6,2 ± 0,2

Výsledky prezentované v tabulce 2 ukazují, že pH připravených hydrogelů i jejich supernatantů se v závislosti na složení a ani v závislosti na molekulové hmotnosti použitého hyaluronanu výrazně neměnilo. Pohybovalo přibližně v rozmezí 5 až 6. Dalo by se tedy konstatovat, že z tohoto hlediska jsou použitelné pro případné kožní aplikace.

### 5.2. Chování komplexů HyA-CTAB v prostředí s různým pH

Pro pozorování chování těchto komplexů v extrémnějších pH prostředích byly připraveny dva různé pufrы, první z hydrogenuhličitanu sodného, hydroxidu sodného o pH 9,6 a druhý z kyseliny octové a octanu sodného o pH 3. Byl sledován vzorek, u kterého byl použit hyaluronan o molekulové hmotnosti 1800 kDa, a s hmotnostní koncentrací 2% a CTAB s koncentrací 200 mM. Postup přípravy byl obdobný, jako u ostatních vzorků a je popsán

v bodě 4.2.1. Na cílové pH 3 a 9,6 byly upraveny už zásobní roztoky tenzidu i hyaluronanu před srážením hydrogelů. Vzorky byly po smíchání CTAB a HyA ponechány k pozorování při laboratorní teplotě.



*Obr. 17: Vzorky po smíchání HyA a CTAB, vpravo vzorek s pH 3, vlevo vzorek s pH 9,6.*



*Obr. 18: Vzorky po pěti dnech, vlevo vzorek s pH 3, vpravo vzorek s pH 9,6.*

Již při přípravě roztoku hyaluronanu, který byl rozpuštěn v pufru, byly vidět první rozdíly v chování. Hyaluronan rozpuštěný v pufru o pH 9,6 se zdál patrně méně tekutější, než HyA v kyselém prostředí. Tento fakt poukazuje na jeho částečné rozkládání již při přípravě zásobního roztoku. Z obrázku číslo 17 je vidět, že ihned po smíchání došlo k tvorbě komplexů u vzorku v kyselém pH a vytvoření fázového rozhraní. Naproti tomu u vzorku v zásaditém

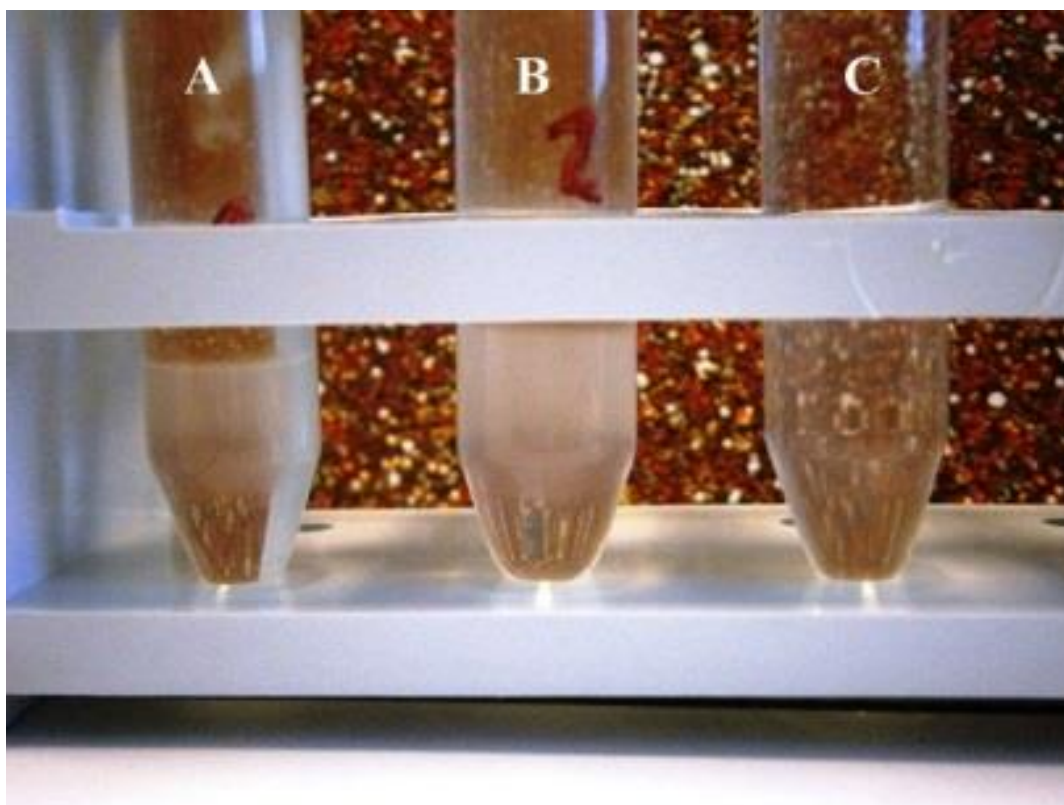
prostředí nebyla viditelně pozorovatelná žádná reakce. Zásadité pH tudíž potlačuje interakci mezi polyelektrolytem a tenzidem.

Po několika dnech u kyselého vzorku došlo k rozkladu HyA díky kyselé hydrolyze řetězce a částečnému vysrážení CTAB. Zásaditý vzorek vytvořil homogenní viskózní roztok bez fázové separace (obr. 18). Působením extrémnějšího pH vznikají tudíž nežádoucí efekty a prostředí hydrogelu by se mělo pohybovat kolem jeho pH, naměřeném v části 5.1.

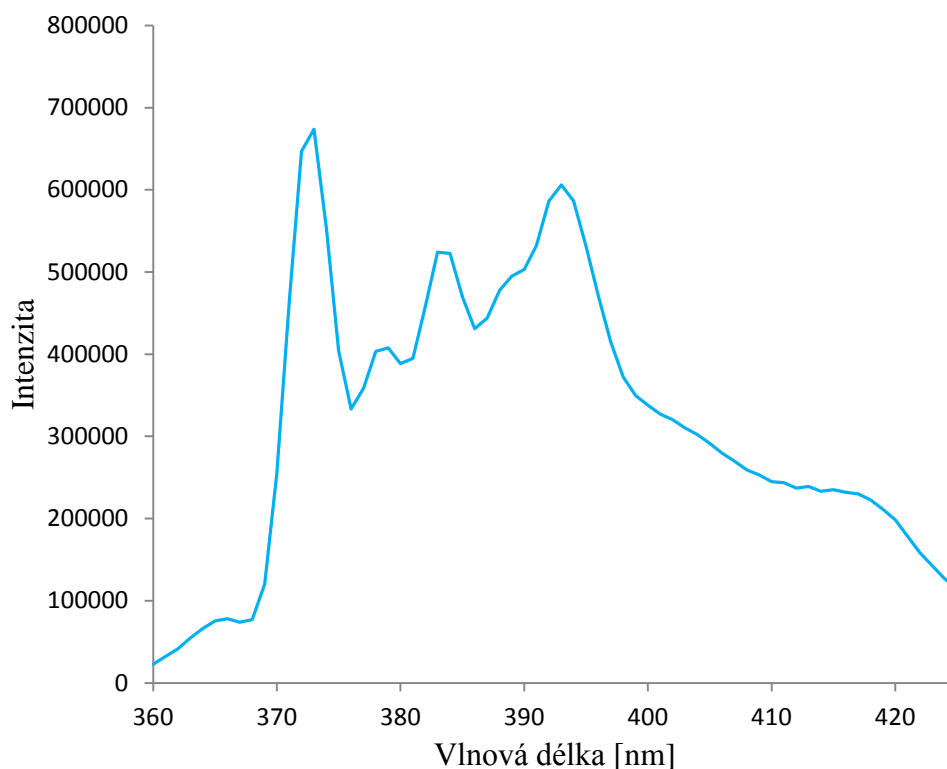
### 5.3. Měření stability fluorescenční spektroskopii

Druhá část práce je zaměřena na sledování stability hydrofobních domén ve vzorcích, připravených ve fyziologickém roztoku 0,15 M NaCl, pomocí fluorescenční spektroskopie. Pro sledování byly využity tři různé vzorky: 200/2(87), 200/2(458) a 200/2(936). Pro fluorescenci byla přidána sonda pyren a princip měření je popsán v bodě 2.4.3.1.

Pozorovány byly celkem dvě sady vzorků. Jedna sada tří různých vzorků byla skladována v lednici při přibližně 4 °C. Před měřením na přístroji Fluorolog byly tyto vzorky vždy vytemperovány na laboratorní teplotu. Druhá sada byla skladována při laboratorní teplotě. Obě sady byly měřeny v intervalu 4 až 7 dní.



*Obr. 19: Sada 3 různých hydrogelů měřených fluorescenční spektroskopii. A – 200/90-130/2, B – 200/300-500/2, C – 200/750-1000/2. U vzorku A a B je pozorovatelné fázové rozhraní mezi hydrogelem a supernatantem, a to nad zakalenou částí hydrogelu. U vzorku C je toto rozhraní velmi obtížně pozorovatelné, neboť hydrogel zakalený nebyl.*

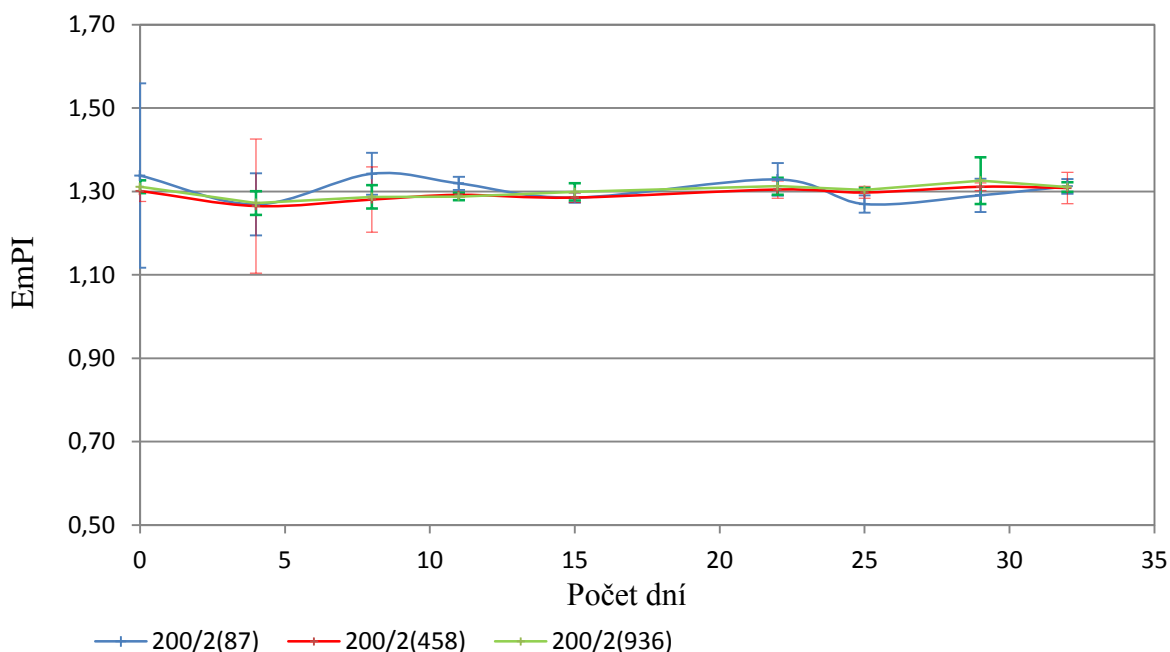


*Obr. 20: Fluorescenční emisní spektrum pyrenu měřené v programu FluorEssence.*

Na obrázku č. 20 je zobrazeno fluorescenční emisní spektrum, které bylo výstupem jednoho měření v programu FluorEssence. Program byl nastaven, aby měřil spektrum v rozpětí od 360 nm do 500 nm. Fluorescenční spektrum pyrenu se ve výstupu (obr. 20) nacházelo v rozmezí přibližně 360 nm až 425 nm. Nejdůležitější byly dva píky při  $372\pm 1$  nm a  $383\pm 1$  nm, jejichž intenzity se z výstupu odečítaly.

Tab. 3 Výsledky měření sady tří vzorků, 200/2(87), 200/2(458) a 200/2(936), skladované při 4 °C. \*Průměrná hodnota EmPI ze třech opakování měření.

	Počet dní								
	0	4	8	11	15	22	25	29	32
<b>87 kDa</b>									
<b>Průměrná hodnota EmPI*</b>	1,34	1,27	1,34	1,32	1,29	1,33	1,27	1,29	1,31
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,22	0,08	0,05	0,02	0,01	0,04	0,02	0,04	0,02
<b>458 kDa</b>									
<b>Průměrná hodnota EmPI</b>	1,30	1,27	1,28	1,29	1,29	1,31	1,30	1,31	1,31
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,03	0,16	0,08	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,04
<b>936 kDa</b>									
<b>Průměrná hodnota EmPI</b>	1,31	1,27	1,29	1,29	1,30	1,31	1,30	1,33	1,31
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,02	0,03	0,03	0,01	0,02	0,02	0,01	0,06	0,01



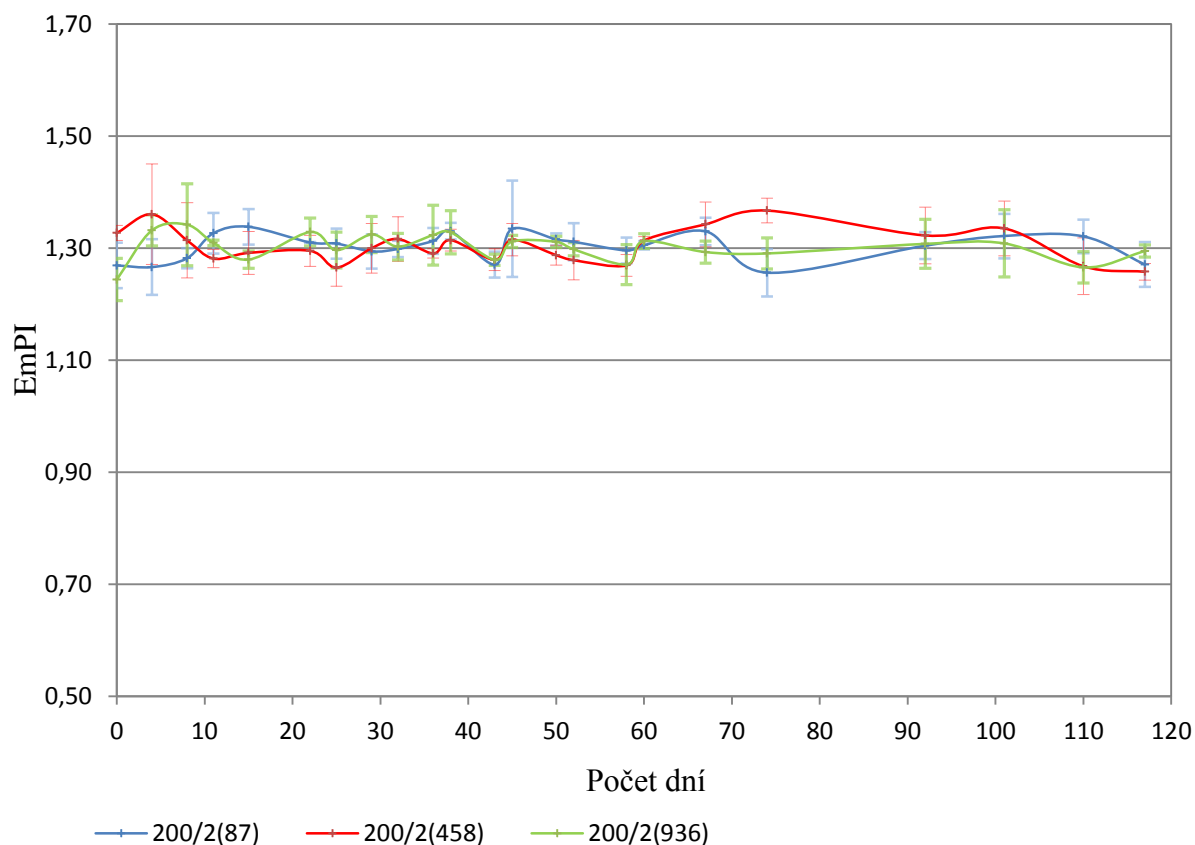
Obr. 21: Graf měření proměnlivosti EmPI v čase sady vzorků skladované při 4 °C.

Graf (obr. 21) zobrazuje průběh měření tří různých vzorků skladovaných při 4 °C. Měření probíhalo přibližně jeden měsíc. Z grafu je patrné, že emisní polaritní index se téměř neměnil, což znamená, že hydrofobní oblasti v těchto HyA-CTAB komplexech byly stabilní a jejich vlastnosti se po dobu měřeného času neměnily. Po jednom měsíci měření muselo být ukončeno, protože volný tenzid se při nízkých teplotách vysrážel a opakovaným zahříváním a chlazením byla narušena integrita gelu. Lze se tedy konstatovat, že skladování při nižší teplotě tedy není vhodné.

Tab. 4 Výsledky měření sady tří vzorků, 200/2(87), 200/2(458) a 200/2(936), skladované při laboratorní teplotě. \*Průměrná hodnota EmPI ze třech opakování měření

Počet dní	87 kDa		458 kDa		936 kDa	
	Průměrná hodnota EmPI*	Směrodatná odchylka	Průměrná hodnota EmPI	Směrodatná odchylka	Průměrná hodnota EmPI	Směrodatná odchylka
0	1,27	0,04	1,33	0,01	1,24	0,04
4	1,27	0,05	1,36	0,09	1,33	0,03
8	1,28	0,02	1,31	0,07	1,34	0,07
11	1,33	0,04	1,28	0,02	1,31	0,01
15	1,34	0,03	1,29	0,04	1,28	0,02
22	1,31	0,00	1,30	0,03	1,33	0,03
25	1,31	0,03	1,27	0,03	1,30	0,03
29	1,29	0,03	1,30	0,04	1,32	0,03
32	1,30	0,01	1,32	0,04	1,30	0,02
36	1,31	0,02	1,29	0,01	1,32	0,05
38	1,33	0,02	1,31	0,02	1,33	0,04
43	1,27	0,02	1,28	0,02	1,28	0,01
45	1,33	0,09	1,32	0,03	1,31	0,01
50	1,32	0,01	1,29	0,02	1,31	0,01
52	1,31	0,03	1,28	0,04	1,30	0,01
58	1,30	0,02	1,27	0,02	1,27	0,04
60	1,31	0,01	1,31	0,01	1,31	0,01
67	1,33	0,03	1,34	0,04	1,29	0,02
74	1,26	0,04	1,37	0,02	1,29	0,03
92	1,30	0,02	1,32	0,05	1,31	0,04
101	1,32	0,04	1,34	0,05	1,31	0,06
110	1,32	0,03	1,27	0,05	1,27	0,03
117	1,27	0,04	1,26	0,02	1,30	0,01





Obr. 22: Graf měření proměnlivosti  $EmPI$  v čase sady vzorků skladované při laboratorní teplotě.

Druhá sada vzorků, která byla skladována při laboratorní teplotě, byla měřena přibližně čtyři měsíce. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 4 a zobrazeny v grafu (obr. 22). Stejně jako u druhé sady i zde se emisní polaritní index téměř neměnil a pohybuje se kolem hodnoty 1,3. Polarita hydrofobní domény hydrogelu se tedy i v takto dlouhém časovém úseku téměř nemění a lze tedy konstatovat, že agregáty obsažené v hydrogelu a jejich nepolární jádra jsou z hlediska polarity ve sledovaném časovém úseku stabilní.

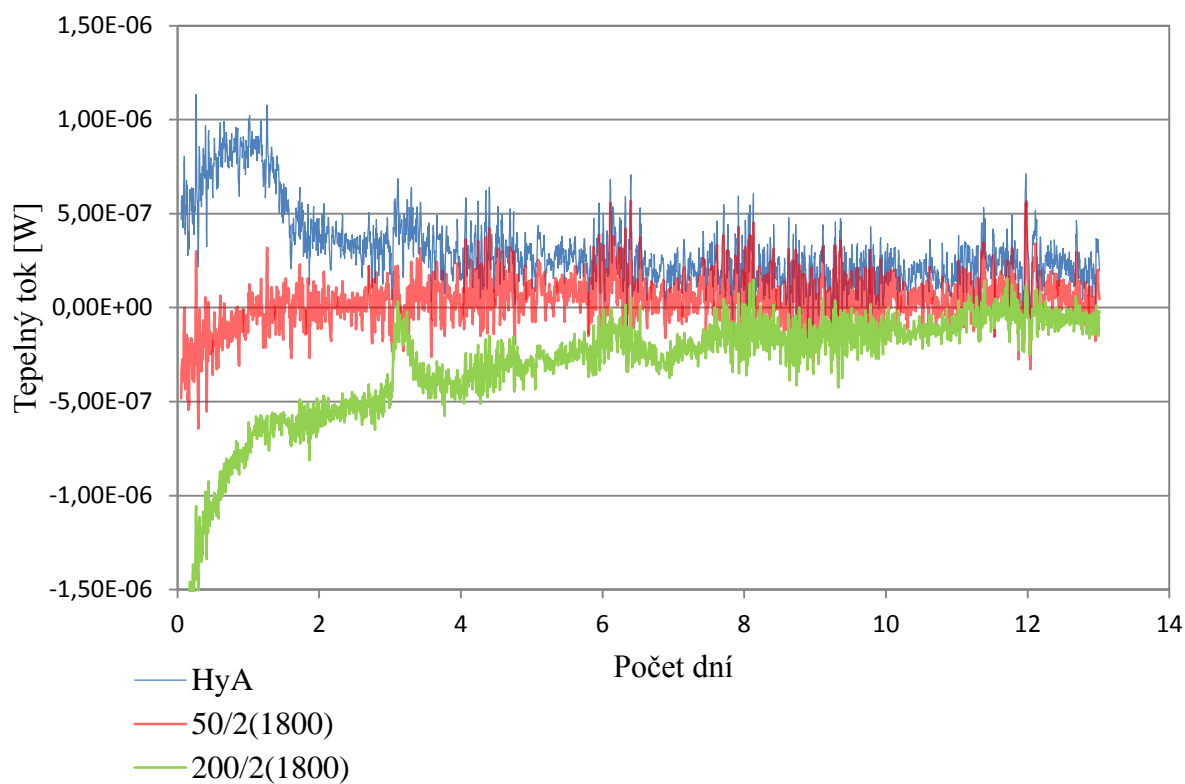
#### 5.4. Kalorimetrické měření hydrogelů

V poslední části práce byl prozkoumán vliv okolního prostředí na hydrogely. Je známo, že se ve vzduchu vyskytují bakterie. Pro tyto mikroorganismy je hyaluronan, jakožto přírodní polysacharid, skvělým zdrojem energie. Byla ověřována stabilita připravených hydrogelů vůči působení těchto bakterií.

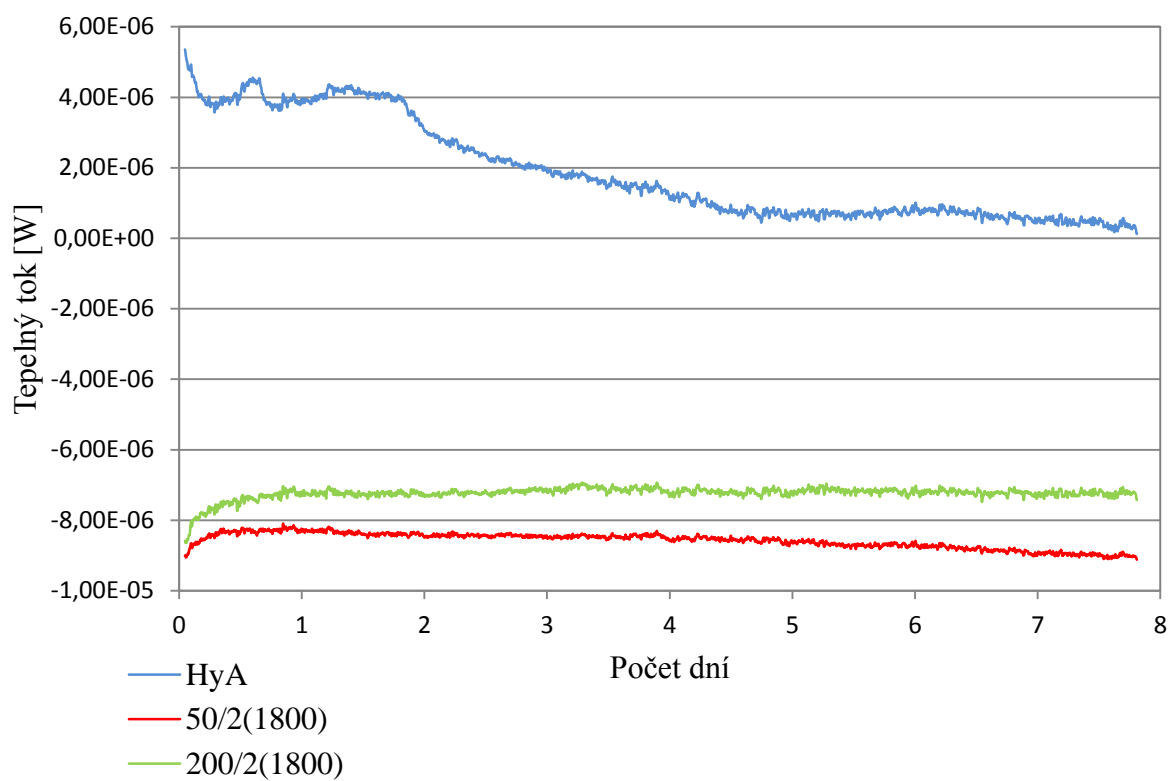
Byly připraveny tři různé vzorky: 50/2(1800), 50/2(1800) a odpovídající roztok samotného hyaluronanu. U vzorků, ke kterým bylo přidáno CTAB, by se vliv okolních bakterií projevit neměl, protože CTAB je antiseptický tenzid.

Vzorky byly měřeny na kalorimetru TAM III, který byl nastaven na 25 °C. Při měření byl sledován tepelný tok. Experiment byl proveden dvakrát.





Obr. 23: Graf prvního kalorimetrického měření 2 vzorků hydrogelu a hyaluronanu.



Obr. 24: Graf druhého kalorimetrického měření 2 vzorků hydrogelu a hyaluronanu.

Výsledné grafy (obr. 23, 24) ukazují, že vzorky nevykazovaly téměř žádné tepelné výkyvy. Signál se měnil pouze v řádu několika mikrowattů. Dá se tedy konstatovat, že signál byl konstantní a nedocházelo k žádné biologické aktivitě ve všech měřených vzorcích. Minimální výkyvy se objevily u vzorků, které obsahovaly čistý hyaluronan, na rozdíl od vzorků s CTAB. Podle této metody jsou tedy připravené hydrogely vůči biologické aktivitě prostředí stabilní. Přítomnost CTAB ve vzorku zajistila ještě vyšší stabilitu, protože jako kationaktivní tenzid potlačuje vliv mikroorganismů. Metoda ovšem není vhodná pro toto měření, protože vzorky byly připravovány v roztoku soli chloridu sodného. Přítomnost této soli mohla způsobit konzervační účinky a biologická aktivita mikroorganismů tudíž mohla být potlačena.

## 6 ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývá studiem komplexů polyelektrolyt-tenzid, konkrétně interakcí hyaluronanu a CTAB, které společně tvoří hydrogely. Součástí této práce bylo i zpracování literární rešerše na dané téma. První část práce byla zaměřena na měření pH vzniklých hydrogelů a na jejich chování v extrémnějších pH podmínkách. Po proměření dvanácti různých vzorků, připravovaných v modelu fyziologického roztoku, 0,15 M NaCl, bylo zjištěno, že připravené hydrogely mají pH 5 až 6 a toto pH se výrazně nemění ani v závislosti na složení a ani v závislosti na molekulové hmotnosti použitého hyaluronanu. Dále byla pozorována jejich reakce v kyselém a zásaditém prostředí. Ukázalo se, že vystavením těchto hydrogelů kyselému prostředí vede k vysrážení tenzidu a k rozložení hyaluronanu kyselou hydrolýzou a tím i k destrukci gelu. V zásaditém prostředí se tvoří pouze homogenní viskózní roztok, tudíž toto prostředí potlačuje interakci mezi hyaluronanem a tenzidem.

Ve druhé části práce byla sledována stabilita hydrofobních domén a změny jejich polaritý v připravených hydrogelech. Pro tento účel byla použita fluorescenční spektroskopie a do vzorků byla přidána fluorescenční sonda pyren. Měření vzorků skladovaných v chladu při 4 °C zjistilo, že po přibližně jednom měsíci došlo k narušení integrity gelu a vysrážení tenzidu a tento způsob se ukázal jako nevhodný. Vzorky skladované při laboratorní teplotě byly sledovány po dobu čtyř měsíců a výsledky ukázaly, že tento způsob je vhodný. Při tomto způsobu skladování se polarita domén ve sledovaném čase neměnila a vzorky tudíž byly stabilní.

V poslední části práce byl sledován vliv mikroorganismů přirozeně se vyskytujících v okolí jak na samotný hyaluronan, tak na hydrogely v modelu fyziologického roztoku. Byla využita metoda izotermní mikrokolorimetrie, které v malém množství vzorku dokáže zachytit metabolické teplo, které mikroorganismy produkují při rozkladu hyaluronanu. Po několikadenním měření nebylo metabolické teplo zachyceno. Metoda se ovšem ukázala jako nevhodná, protože vzorky byly připravovány v 0,15 M roztoku NaCl, jakožto modelu fyziologického roztoku, a ten mohl způsobit malé konzervační účinky a potlačit vlivy mikroorganismů.

Hlavním cílem práce bylo prozkoumat tyto hydrogely na bázi hyaluronanu a posoudit jejich případnou použitelnost pro medicínské aplikace. Lze tedy konstatovat, že tento cíl byl splněn. Tato práce ukázala, že připravené hydrogely ve fyziologickém roztoku mají vzhledem k lidské kůži neutrální pH a jsou tudíž vhodné pro případné kožní aplikace. Jsou odolné vůči mikrobiologickým vlivům okolí a tyto systémy jsou stabilní, pokud nejsou vystaveny nižším teplotám, nebo extrémnějších pH podmínkám. Vzhledem k tomu, že tyto hydrogely vykazují dobré vlastnosti, by bylo vhodné v budoucnu prozkoumat jejich schopnosti vázat a uvolňovat léčiva.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] NOVÁK, J. Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, s. 363-402. ISBN 978-80-7080-675-3.
- [2] POUCHLÝ, J. Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, s. 127-168. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [3] Radiation Formation of Hydrogels for Biomedical Applications. Division of applied radiation chemistry [online]. 2002, [cit. 2014-04-19]. Dostupné z: [http://www.mitr.p.lodz.pl/biomat/raport/2\\_radiation\\_hydrogels.html](http://www.mitr.p.lodz.pl/biomat/raport/2_radiation_hydrogels.html)
- [4] PEPPAS, N.A., B.V. SLAUGHTER a M.A. KANZELBERGER. 9.20 – Hydrogels. Polymer Science: A Comprehensive Reference [online]. 2012, č. 9, s. 385–395 [cit. 2014-04-19]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444533494002260>
- [5] ROSIAK, J.M. a F. YOSHII. Hydrogels and their medical applications. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms [online]. 1999, č. 151 [cit. 2014-04-19]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168583X99001184>
- [6] ŠMIDRKAL, J. Tenzidy a detergenty dnes. Chemické listy. 1999, č. 93, s. 421-427.
- [7] HOLMBERG, K. Surfactants and polymers in aqueous solution. 2. vyd. Chichester: John Wiley, 2003, s. 1-3. ISBN 04-714-9883-1.
- [8] CTAB. P212121 [online]. 2014 [cit. 2014-04-19]. Dostupné z: <http://store.p212121.com/ctab/>
- [9] DOBRYNIN, A.V. a M. RUBINSTEIN. Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. Progress in Polymer Science [online]. 2005, č. 30, s. 1049-1118 [cit. 2014-04-19]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670005000936>
- [10] AMOS, L., M. SCHÖNHOF, Y. LUAN, H. MÖHWALD a G. BREZESINSKI. Electrostatic interactions between polyelectrolyte and amphiphiles in two- and three-dimensional systems. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects [online]. 2007, 1-2, s. 79-88 [cit. 2014-04-19]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092777570700218X>
- [11] KÖTZ, J., S. KOSMELLA a T. BEITZ. Self-assembled polyelectrolyte systems. Progress in Polymer Science [online]. 2001, č. 8, s. 1199-1232 [cit. 2014-04-19]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670001000168>
- [12] GARG, H.G. a Ch.A. HALES. Chemistry and biology of hyaluronan [online]. 1st ed. Elsevier, 2004, s. 1-11 [cit. 2014-04-20]. ISBN 00-804-4382-6. Dostupné z: [books.google.cz/books?isbn=0080472222](http://books.google.cz/books?isbn=0080472222)

- [13] SLAUGHTER, B.V., S.S. KHURSHID, O.Z. FISHER, A. KHADEMHOSEINI a N.A. PEPPAS. Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials*. 2009, č. 21, s. 3307-3329. Dostupné z: <http://www.tissueeng.net/lab/papers/hydrogels%20in%20regenerative%20medicine.pdf>
- [14] HASCALL, V.C. a T.C. LAURENT. Hyaluronan: Structure and physical properties. *Glycoforum* [online]. 1997 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [15] SCOTT, J.E. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solutions. Some biological consequences. *Glycoforum* [online]. 1998 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [16] SCHIRALDI, Ch., A.L. GATTA, M.D. ROSSA a M. ELNASHAR (Ed.). *Biopolymers: Biotechnological Production and Application of Hyaluronan* [online]. Sciyo, 2010, s. 387-412 [cit. 2014-04-20]. ISBN 978-953-307-109-1. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/biopolymers/biotechnological-production-characterization-and-application-of-hyaluronan>
- [17] KLÁN, P. *Organická fotochemie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2001, 121 s. ISBN 80-210-2526-3.
- [18] Jablonski diagram. *ChemWiki* [online]. 2012 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: [http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical\\_Chemistry/Spectroscopy/Electronic\\_Spectroscopy/Jablonski\\_diagram](http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Jablonski_diagram)
- [19] Principy fluorescenční spektroskopie. FIŠAR, Z. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách* [online]. 2009 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>
- [20] VALEUR, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Application* [online]. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, s. 11-15 [cit. 2014-04-20]. ISBN 35-276-0024-8. Dostupné z: [http://physweb.bgu.ac.il/~bogomole/Books/Valeur%20B%20-%20Molecular%20Fluorescence%20Principles%20And%20Applications%20-%20\(Wiley-Vch%202001\\_%20399%20P\).pdf](http://physweb.bgu.ac.il/~bogomole/Books/Valeur%20B%20-%20Molecular%20Fluorescence%20Principles%20And%20Applications%20-%20(Wiley-Vch%202001_%20399%20P).pdf)
- [21] AGUIAR, J., P. CARPENA, J.A. MOLINA-BOLÍVAR a C. Carnero RUIZ. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1: 3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2003, roč. 258, č. 1, s. 116-122 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://atarazanas.sci.uma.es/docs/tesisuma/16643604.pdf>
- [22] Oficiální výukové materiály Ústavu fyzikální chemie VŠCHT <http://www.vscht.cz/fch/cz/pomucky/SPK.pdf>
- [23] HOWELL, M., D. WIRZ, A. U. DANIELS a O. BRAISSANT. Application of a Microcalorimetric Method for Determining Drug Susceptibility in Mycobacterium Species. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2012, roč. 50, č. 1, s. 16-20 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3256699/>
- [24] HOFFMAN, A.S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2002, roč. 54, č. 1, s. 3-12 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X01002393>

- [25] SINGH, B. a L. PAL. Sterculia crosslinked PVA and PVA-poly(AAm) hydrogel wound dressings for slow drug delivery: Mechanical, mucoadhesive, biocompatible and permeability properties. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* [online]. 2012, roč. 9, s. 9-21 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751616112000422>
- [26] SCHEUER, C.A., K.M. FRIDMAN, V.L. BARNIAK, S.E. BURKE a S. VENKATESH. Retention of conditioning agent hyaluronan on hydrogel contact lenses. *Contact Lens and Anterior Eye* [online]. 2010, roč. 33, č. 1, s. S2-S6 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367048410001311>
- [27] VASI, A., M. I. POPA, M. BUTNARU, G. DODI, L. VERESTIUC. Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2014, roč. 38, s. 177-185 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493114000605>
- [28] PETZOLD, G., V. DUTSCHK, M. MENDE, R. MILLER. Interaction of cationic surfactant and anionic polyelectrolytes in mixed aqueous solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2008, roč. 319, 1-3, s. 43-50 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775707006334?np=y>
- [29] SHULEVICH, Y. V., G. PETZOLD, A. V. NAVROTSKII a I. A. NOVAKOV. Properties of polyelectrolyte–surfactant complexes obtained by polymerization of an ionic monomer in a solution of an oppositely charged surfactant. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2012, roč. 415, s. 148-152 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775712006899>
- [30] THALBERG, K. a B. LINDMAN. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *The Journal of Physical Chemistry*. 1989, roč. 93, č. 4, s. 1478-1483.
- [31] THALBERG, K., B. LINDMAN a G. KARLSTRÖM. Phase behavior of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: the effect of salt. *The Journal of Physical Chemistry*. 1991, roč. 95, č. 15, s. 6004-6011.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

### 8.1. Seznam zkratek

Zkratka	Význam
AA	
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimetylamonium bromid
Da	dalton ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
EmPI	emisní polaritní index
FTIR	Fourierova infračervená spektroskopie
$^1\text{H}$ NMR	protonová nukleární magnetická rezonance
HyA	kyselina hyaluronová
IMC	Izotermní mikrokolorimetrie
$M_w$	molekulová hmotnost
NMR	nukleární magnetická rezonance
PVA	polyvinylalkohol
PVA-AAm	směs polyvinylalkoholu a akrylamidu
SDS	dodecylsulfát sodný
SEM	rastrovací elektronový mikroskop
TGA	tepelná gravimetrická analýza

### 8.2. Seznam symbolů

Symbol	Význam
M	$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
$S_1$	první singletový excitovaný stav molekuly
$S_2$	druhý singletový excitovaný stav molekuly
$T_1$	první tripletový excitovaný stav molekuly
$T_2$	druhý tripletový excitovaný stav molekuly